

Ф.К. Алимова

**Промышленное применение
грибов рода *Trichoderma***

Казань
Казанский государственный университет
2006

УДК 579
ББК 28.4
А 50

Алимова Ф.К.

А 50 Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф.К.Алимова. – Казань: Казанский государственный университет им.В.И.Ульянова-Ленина, 2006. – 209 с.+ 4 фотогр.

ISBN 5-98180-300-2

Промышленное применение гриба *Trichoderma* вносит существенный вклад в решение таких глобальных проблем, как обеспечение человека продовольствием и переработка отходов. Ферменты гриба *Trichoderma* успешно используются в текстильной и пищевой промышленности, в алкогольном производстве, в виноделии и производстве соков, при получении оливкового масла, в деревообрабатывающей и бумажной промышленности, в производстве кормов и биофунгицидов.

В монографии обобщен опыт, накопленный автором в течение многолетнего изучения грибов рода *Trichoderma*, и данные литературы.

Монография предназначена для аспирантов и студентов-биологов.

УДК 579
ББК 28.4

ISBN 5-98180-

© Алимова Ф.К., 2006

Содержание

Введение	4
Глава 1. Развитие системы рода <i>Trichoderma</i> и морфологическая характеристика <i>Trichoderma</i>	5
1.1. Развитие системы и морфологическая характеристика рода <i>Trichoderma</i>	5
1.2. Общая морфологическая характеристика <i>Trichoderma</i> / <i>Hypocrea</i>	17
Глава 2. Метаболиты <i>Trichoderma</i>	20
2.1. Литические ферменты <i>Trichoderma</i>	20
2.1.1. Характеристика целлюлазного комплекса <i>Trichoderma</i>	21
2.1.1.1. Регуляция экспрессии целлюлазы.....	28
2.1.2. Характеристика ксиланазного комплекса <i>Trichoderma</i>	33
2.1.2.1. Регуляция экспрессии гемицеллюлаз.....	43
2.1.3. Характеристика глюканаз рода <i>Trichoderma</i>	45
2.1.4. Характеристика протеаз <i>Trichoderma</i>	49
2.1.5. Хитинолитические ферменты и их гены.....	54
2.1.5.1. Хитинолитические ферменты <i>Trichoderma</i>	54
2.1.5.2. Регуляция экспрессии генов хитиназ.....	58
2.1.5.3. Другие гидролазы <i>Trichoderma</i>	64
2.2. Другие метаболиты <i>Trichoderma</i>	65
Глава 3. Влияние метаболитов <i>Trichoderma</i> на биоту	67
3.1. Виды <i>Trichoderma</i> как агенты биоконтроля фитопатогенных микроорганизмов.....	67
3.2. <i>Trichoderma</i> как возбудитель плесневения культурных грибов.....	85
3.3. Влияние грибов рода <i>Trichoderma</i> на человека.....	92
3.3.1. Использование грибов рода <i>Trichoderma</i> в медицине.....	97
3.4. Взаимодействия с растениями.....	98
3.4.1. Отрицательные взаимодействия с растениями.....	98
3.4.2. Положительные взаимодействия с растениями и резистентность к патогенам.....	101
3.4.3. Индукция резистентности растений.....	105
Глава 4. Промышленное применение <i>Trichoderma</i>	112
4.1. Промышленное применение ферментов <i>Trichoderma</i>	112
4.1.1. Применение целлюлаз <i>Trichoderma</i>	112
4.2. Применение ферментов <i>Trichoderma</i> в текстильной промышленности.....	120
4.3. Применение ферментов в пищевой и кормовой промышленности.....	130
4.3.1. Алкогольное производство.....	130
4.3.2. Виноделие и производство соков.....	133
4.3.3. Получение оливкового масла.....	135
4.3.4. Производство кормов.....	136
4.4. Применение ферментов <i>Trichoderma reesei</i> в деревообрабатывающей и бумажной промышленности.....	144
4.5. Получение чужеродных белков с помощью <i>Trichoderma</i>	147
4.6. Производство и применение биофунгицидов на основе <i>Trichoderma</i>	154
4.6.1. Требования к разработке успешных биоконтрольных систем.....	155
4.6.2. Производство препаратов на основе <i>Trichoderma</i>	160
4.6.3. Препаративные формы биофунгицида на основе <i>Trichoderma</i> в России....	173
4.7. Применение <i>Trichoderma</i> для переработки отходов.....	175
4.7.1. Получение биокомпостов с применением <i>Trichoderma</i>	175
4.7.2. Применение <i>Trichoderma</i> в сельском хозяйстве РТ.....	183
4.7.2.1. Переработка отходов для получения биофунгицидов и биокомпоста с помощью <i>Trichoderma</i>	183
4.7.2.2. Производство корма для животных.....	189
Литература	193

*Посвящается памяти моих учителей:
Маргариты Ильинишны Беляевой,
Виктора Григорьевича Винтера,
Альфий Наримановны Аскаровой*

Введение

Одним из наиболее изучаемых грибов в настоящее время является род *Trichoderma*. Возможно, что *Trichoderma* – это единственный род, для которого каждый вид представлен в Генетическом Банке, по крайней мере, одним геном, и многие виды представлены последовательностью двух или более генов.

Причиной этого интереса является большая практическая и экологическая значимость рода. Виды *Trichoderma* являются продуцентами ферментов (целлюлаз, хитиназ, пектиназ, ксиланаз, серинзависимых протеиназ и др.), используемых в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, в производстве моющих средств, в получении спирта, преобразовании отходов, содержащих целлюлозу, в глюкозу (Kubicek et al., 1998; Harman et al., 2004; Franco et al., 2004), получении кормовых добавок (Ташпулатов, 1987; Samuels et al., 1996; Скворцов и др., 2002) и текстильной промышленности (Abd El-Rahim et al., 2003). На основе антибиотиков, токсинов, ферментов грибов этого рода получают препараты для биологического контроля болезней и стимуляции роста растений, получения трансгенных растений (Сидорова, 1980; Алимова и др., 1990а, б; Громовых, 2002; Harman et al., 2004; Гринько, 2004; Alimova et al., 2002). *Trichoderma* также используется для биологической очистки почвы и для компостирования отходов (Harman et al., 2003; Кучмина и др., 2001; Алимова и др., 2002; Cotxarrera et al., 2002). Известны также и другие свойства *Trichoderma* spp. Так, выявлены виды *Trichoderma*, поражающие выращиваемые промышленным способом грибы и повреждающие строительные конструкции (Castle et al., 1998; Muthumeenakshi et al., 1998; Kildesø et al., 2003; Samuels et al., 2002). Они могут быть причиной аллергии и глубоких микозов у людей со сниженным иммунитетом (Kredics et al., 2003; Munoz, 1997). Представителей рода *Trichoderma* можно найти практически во всех почвах. Их считают, по крайней мере частично, ответственными за эффект биологического контроля фитопатогенов в супрессивных почвах, на которых зерновые и деревья не подвергаются действию патогена и выделению в окружающую среду микотоксинов (Lees-Haley, 2003). Обнаружена способность метаболитов *Trichoderma* подавлять жизнедеятельность насекомых (Geandha et al., 2003). Грибы рода *Trichoderma* являются основными ассоциативными микроорганизмами лишайников (Смирнов, Лобакова, 2006).

Глава 1. Развитие системы рода *Trichoderma* и морфологическая характеристика *Trichoderma*

1.1. Развитие системы и морфологическая характеристика рода *Trichoderma*

Сокращения:

ЦТК	цикл трикарбоновых кислот;
АТФ	аденозин трифосфаты;
ПВК	пировиноградная кислота;
кДНК	комплементарная ДНК.

На современном этапе изучения представителей царства *Mycota* род *Trichoderma* рассматривается с позиций геномики¹ и протеомики². В более общем смысле, геномика определяется как «наука о получении информации о живых организмах путем системного подхода, и которую можно применить в широком масштабе». Десять лет назад геномика включала количественные исследования генов, анализ регуляторных и некодирующих сиквенсов и геномов. В настоящее время геномика претерпевает переход от картирования и сиквенирования геномов к функции генома. Для того чтобы отразить эту связь, анализ генома сейчас разделяют на «структурную геномику» (накопление и анализ информации о генах) и «функциональную геномику» (накопление и анализ информации о функции генов). Цель функциональной геномики получить как можно больше и быстрее информацию о множестве генов.

Информация о геноме особенно важна для поиска новых генов, интересных для биотехнологии.

Определение точных таксономических групп является ключевым фактором идентификации штаммов *Trichoderma*. Это позволит развивать новые технологии, основанные на генетическом разнообразии этого рода.

Однако, то, что род *Trichoderma* является многокомпонентным и сложным, затрудняет понимание биологии видов и влияет на коммерческое использование. Как было отмечено выше, грибы рода *Trichoderma* являются одним из наиболее изучаемых грибов в настоящее время. Поэтому молекулярная таксономия рода *Trichoderma* изучается более чем таксономия других родов грибов (табл. 1.1, 1.2).

Аудик и Клавери (Audic, Claverie, 1997) были первыми исследователями, применившими термин «цифровой (digital) геномики» для изучения экспрессии гена путем случайного выбора последовательностей в популяциях кДНК, объединенных по принципу условий, стадии развития, органоспецифичности или тканеспецифичности, и представленных в компьютерных базах данных. В широком смысле термин «цифровая геномика» следует понимать как выборку данных среди «сиквенсов», собранных в базах данных в результате независимых классических специальных экспериментов.

¹ Геномика – наука о картировании, сиквенировании, анализе генома и его функций.

² Протеомика – наука об описании полного набора белков, который экспрессируется и модифицируется при функционировании геномов в течение всей жизни клетки или в специфическое время.

Т а б л и ц а 1.1

Число ITS сиквенсов, установленных для разных грибов

Организм/Род	Число сиквенсов
Грибы	42402
<i>Fusarium</i>	1714
<i>Aspergillus</i>	1260
<i>Trichoderma</i>	1016
<i>Neurospora</i>	580
<i>Colletotrichum</i>	527
<i>Penicillium</i>	482
<i>Verticillium</i>	331
<i>Ustilago</i>	63
<i>Rhizopus</i>	61
<i>Botrydis</i>	52

Т а б л и ц а 1.2

Общее число сиквенсов *Trichoderma*, доступных в базах данных до декабря 2002 года

Тип сиквенса	Методы	Количество сиквенсов	Свободный доступ
EST (Genencor)	Высокопроизвод..	11050	Частичный
EST (NewBioTechnic)	Высокопроизвод	1300*	нет
EST (USP)а	Высокопроизвод.	1200*	да
ITS	Классический	1016	да
Патент	Классический	99	да
Гидролазы	Классический	148	да
Другие	Классический	56	да

Базы: а – Университет Сан-Пауло; * - Unigenes

Анализ компьютерных данных цифровой геномики *Trichoderma* показал, что:

а) грибы рода *Trichoderma* активно используются и являются объектом активного исследования. По сравнению с *Trichoderma* только некоторые грибы так же часто цитируются в PubMed. Из 15 грибов, представленных в *Fungal International Initiative (FII)*, только 9 видов цитируются в литературе чаще, чем *T. reesei* и *T. harzianum*. Несмотря на огромное число работ в области геномики, в компьютерных базах данных представлено ограниченное количество «сиквенсов». Большинство работ по *Trichoderma* посвящено коммерческому использованию или физиологии и биохимии видов рода;

б) анализ представленных в работах последовательностей ДНК показал, что таксономическое исследование рода *Trichoderma* является активной областью науки. Показано, что 1016 последовательностей из 1319 последовательностей *Trichoderma* относятся к внутренним транскрибируемым последовательностям ITS. Кроме того, определены 64 последовательности гена *chit 42* и 32 последовательности гена *tefl*, используемые в таксономических исследованиях.

Возможно, в ГенБанке уже к 2006 году будет представлено более

70000 сиквенсов уникальных последовательностей *Trichoderma*. Изучение таксономии рода *Trichoderma* на современном этапе связано помимо геномики и с протеомикой, в связи со способностью этих грибов гидролизовать полимеры.

Термин «протеомика», появившийся в 1994 году как лингвистический эквивалент концепции генома, используется для описания полного набора белков, который экспрессируется и модифицируется при функционировании геномов в течение всей жизни клетки. Термин также используется в универсальном смысле для описания набора белков, образованных в клетке в специфическое время. Вайнштейн (Weinstein, 1998) предложил термин «омики» для обозначения областей исследования, таких, как «протеомика» (экспрессия белков), «транскриптомика» (РНК и экспрессия гена) и «метаболомика» (метаболиты и метаболические сети). Для установления комплексного взаимодействия генных продуктов и регуляторных сиквенсов решающим фактором становятся экспериментальные подходы.

Протеомика включает изучение протеома с помощью технологии крупномасштабного разделения белков, их идентификации для разработки интегрированного взгляда на клеточные процессы, такие, как уровни экспрессии, пост-трансляционную модификацию, белок-белок взаимодействия. Протеомика включает классификацию и характеристику клеточных белков, изучает вариации экспрессии при разных физиологических условиях и взаимодействия белков, идентифицирует функции белков в разных метаболических процессах. Таким образом, протеомика предоставляет фундаментальное знание для понимания всех биологических процессов (Marra et al., 2006). Использование протеомной технологии возросло, поскольку эффект генетических изменений и влияние окружающих условий можно увидеть на гелях, полученных путем двумерного электрофореза белков. Очищенные белки можно фрагментировать и исследовать с помощью пептид масс-фингерпринтинга или с помощью электро-, спрей-, масс-спектрометрии и/или с помощью микросиквенирования по Эрдману.

Литическая и антагонистическая активность *Trichoderma* обеспечивается несколькими генами, кодирующими внеклеточные гидролазы, в том числе эндохитиназы, β -N-ацетилгексоаминидазы, протеазы, хитин-1,4- β -хитобиозидазы, эндо- и экзо- β -1,3-глюканазы, липазы, ксиланазы, маннаназы, пектиназы, пектинлиазы, амилазы, фосфолипазы, РНКазы, ДНКазы и т.д. (Zembek et al., 2006; Ciliento et al., 2006; Djonovic et al., 2006a).

Хитиноподобные и глюканолитические ферменты катализируют гидролиз клеточных стенок фитопатогенов, поскольку разрушают полимеры, не встречающиеся в растительных клетках. Каждый класс гидролаз состоит из нескольких ферментов, различающихся по активности. Гены гидролаз идентифицированы (табл. 1.3) и клонированы (Ait-Lahsen et al., 2001; Limon et al., 1995; Lora et al., 1995; Lorito et al., 1993, 1994; Peterbauer et al., 1996; Viterbo et al., 2001; 2002; Stricker et al., 2006; Ward, 2006; Kovacs et al., 2006).

Остальные сиквенсы генов *Trichoderma* можно разделить на функциональные группы на основании известных сиквенсов, представленных в базах данных (рис. 1.1).

Таблица 1.3

Гидролитические ферменты, их гены в базах данных

Полимер	Ген/ фермент	N*
хитин	Chit42 (эндохитиназа)	64
	Chit33 (эндохитиназа)	2
	Nag1 (хитобиозидаза)	2
	Nag2 (хитобиозидаза)	2
	Ехс1 (экзохитиназа)	1
	Ехс2 (экзохитиназа)	1
	Ech2	2
	Ech3	2
	Ech3B	2
	Cht1	3
	Cht2	2
	Chit33 (эндохитиназа)	2
	Chit36Y	2
	Chit-VIRI	1
	Chit-P	1
	Chit-HAM	1
	Chit-HAR1	1
	Chit-HAR2	1
	Chit-HAR3	1
	Chit-G2	1
Глюкан	Bgn1 (эндо- β -1,3-глюканаза)	1
	Bgn2 (эндо- β -1,3-глюканаза)	1
	Bgn3 (эндо- β -1,6-глюканаза)	2
	Gluc78 (экзо- β -1,3-глюканаза)	2
	B16-1 (эндо- β -1,6-глюканаза)	2
	B16-2 (эндо- β -1,6-глюканаза)	2
	B16-3 (эндо- β -1,6-глюканаза)	2
Целлюлоза	Cbh1 (β -1,4-глюкан-целлобиогидролаза)	7
	Cbh2 (β -1,4-глюкан-целлобиогидролаза)	6
	Cel2A (β -1,4-эндоглюканаза)	2
	EglI (β -1,4-эндоглюканаза)	1
	EglII (β -1,4-эндоглюканаза)	1
	EglIII (β -1,4-эндоглюканаза)	1
EglIV (β -1,4-эндоглюканаза)	1	
Мутан	β -1,3-глюканаза	3
Ксилан	Xyl1 (β -ксиланаза)	2
	Xyn2 (β -ксиланаза)	2
	Xyn3 (β -ксиланаза)	1
	Эндо- β -1,4-ксиланаза)	1
	β -глюкуронидаза	1
	β -L-арабинофуранозидидаза	1

N* – число сиквенсов в базах данных.

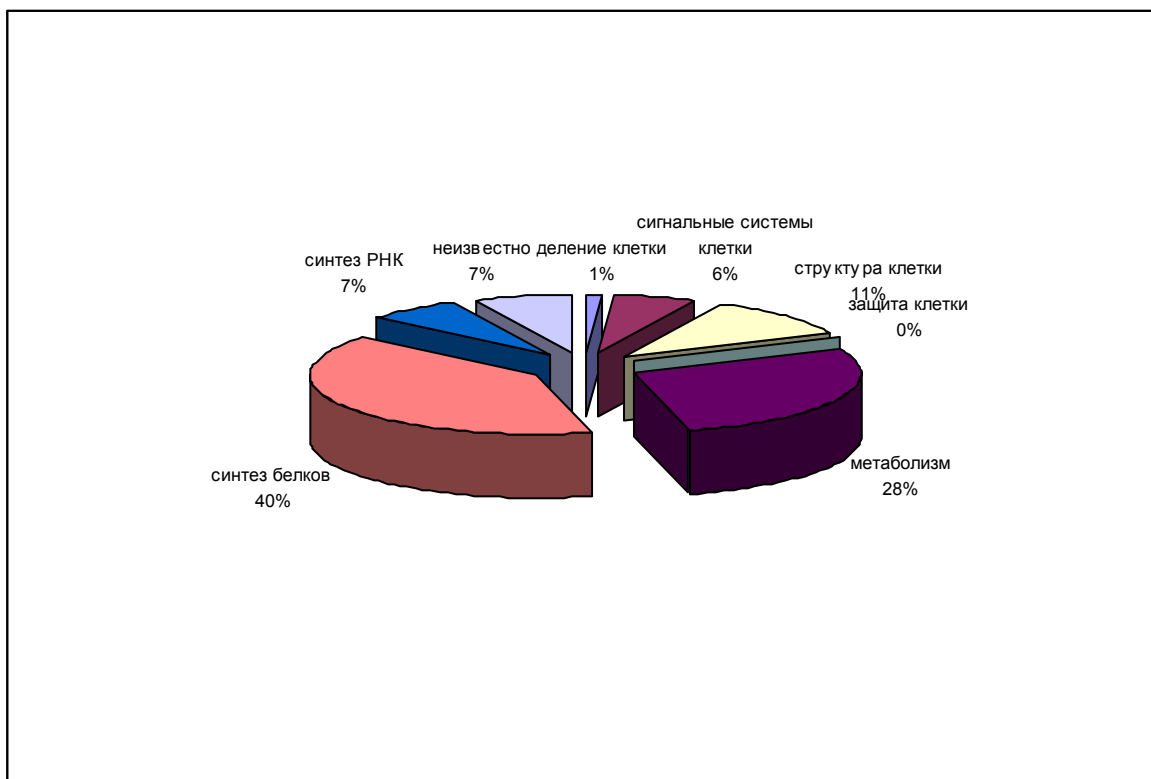


Рис. 1.1. Функциональное назначение сиквенсов *Trichoderma*, доступных в базах данных, согласно классификации, разработанной Institute for Genomic Research (TIGR, Роквилл США). Не классифицированные ITS сиквенсы либо гомологичны известным сиквенсам, либо не использовались в других схемах.

Получено 2500 сиквенсов, отвечающих критериям параметров (минимальная длина сиквенса составляла 150 нуклеотидов). Из всех сиквенсов 1011 EST составляли синглтоны, и 1483 сиквенса формировали 315 кластеров. Таким образом, получено 1326 частичных сиквенсов экспрессирующихся генов *T.harzianum* и *T.atroviride*. Кластеры содержали от 2 до 68 сиквенсов, из них 230 кластеров содержали по 2 или 4 сиквенса, 51 кластер содержал от 5 до 8 сиквенсов, и 15 кластеров содержали от 9 до 12 сиквенсов, и только 19 кластеров содержали более 12 сиквенсов. На 2003 год известна функция ряда кластеров в геноме *Trichoderma* (табл. 1.4).

С использованием программы BLAST (Altschul et al., 1990) при счете > 80 общее количество EST, клеточная роль которых может быть установлена на основании гомологии сиквенсов с сиквенсами с неизвестной функцией, составило 714. Оставшиеся сиквенсы (914) либо не классифицированы, либо гомологичны сиквенсам с неизвестной функцией или соответствуют многим белкам, указанным в базах данных. Сиквенсы, кодирующие белки с предполагаемой функцией, гомологичные белкам в базе NCBI, были классифицированы на различные функциональные группы (рис. 1.2). Многие транскрипты являлись продуктами генов, участвующими в синтезе белка и РНК.

В базе данных находится 1326 сиквенсов экспрессирующихся генов *T. harzianum* и *T. atroviride*. Большинство известных транскриптов принадлежат к группам генов жизнеобеспечения. Интересно, что сравнение данных по *T. resei* и *T. harzianum* показало, что 71% генома грибов негомологичен.

Большие кластеры *Trichoderma* и их частичная функция

№	Кластер	Число сиквенсов	Сходство с данными в базе
1	QA	96	Фактор элонгации 1-альфа
2	PA	61	Предшественник гидрофобина II (HFBI)
3	WA	34	40S рибосомальный белок S5
4	VA	32	Гипотетический консервирующий белок
5	RA	31	Нет
6	TA	31	Нет
7	SA	29	Стрессовый белок DDR48
8	YA	25	Нет
9	CB	21	Вакуолярная АТФаза
10	GB	17	Гистон H3
11	XX	17	40S рибосомальный белок 5S18
12	IF	17	Пептидил изомераза А цитозольная
13	ZA	16	Вакуолярная АТФаза
14	BB	16	Гистон H3
15	TE	15	60S рибосомальный белок а4
16	OE	14	40S рибосомальный белок S9
17	ZZ	13	Фактор транскрипции
18	AB	13	АТФ синтаза белок 9
19	HB	12	Нет

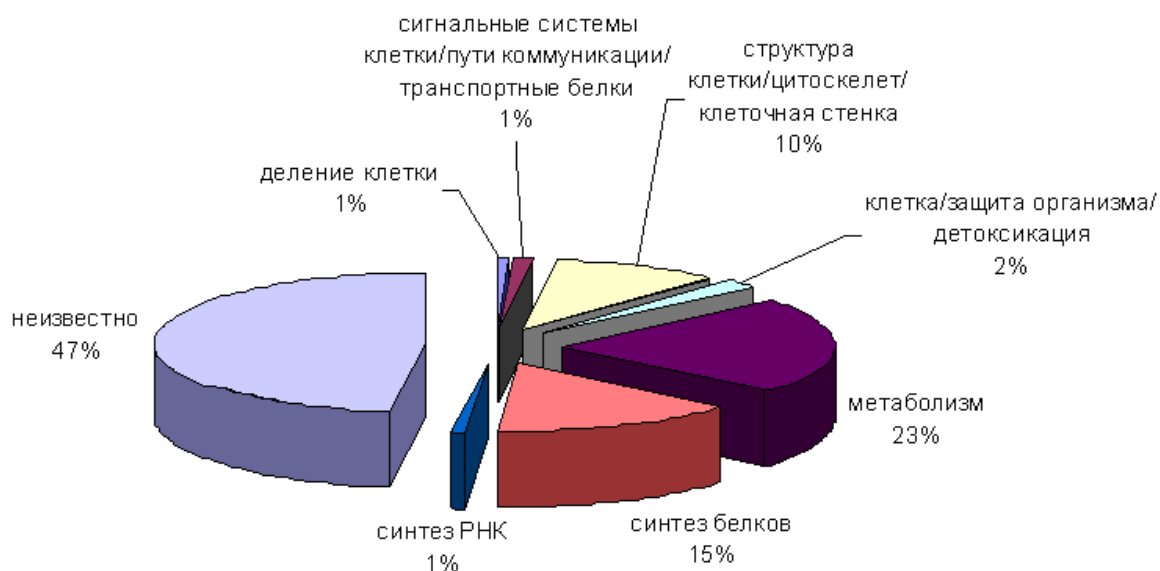


Рис. 1.2. Функциональное назначение последовательностей биоконтрольных штаммов *Trichoderma*, согласно классификации Institute for Genomic Research (TIGR, Роквилл США).

В настоящее время известны вебсайты 379 проектов по изучению геномов. Из них 55 проектов выполнены, а 324 находятся на этапе выполнения. Только 16 проектов (4% от всего количества) посвящены грибам. В данных проектах представлено 12 видов грибов, из которых 7 видов являются патогенами растений и человека. Проекты по

грибам посвящены фитопатогенам, патогенам человека и сапрофитам, геномике грибов *Trichoderma* и установлению EST (экспрессирующихся сиквенсов), сиквенированию и выявлению профиля. Часть проектов оплачено коммерческими организациями (NewBioTechnic в Испании, Genencor в США и VTT в Финляндии и т.д.), что свидетельствует о биотехнологическом значении полученных данных. В настоящее время проводятся исследования по более, чем 30 проектам. Вот некоторые из них:

1) С помощью ДНК анализа разработан метод идентификации и клонирования промоторов, экспрессирующихся при определенных условиях среды, таких, как рост в среде с глюкозой. Авторы получили патент на 5 высокоактивных промоторов.

2) Шамберго с коллегами (Chambergo et al., 2002) с помощью анализа EST и microarray ДНК анализа изучали метаболизм *T. reesei* при аэробной и анаэробной утилизации глюкозы. Авторы пытались решить вопрос о том, почему многоклеточные организмы утилизируют глюкозу путем дыхания, а не путем брожения. В отличие от дрожжей *S. cerevisiae* грибы не способны получать энергию в анаэробных условиях, но синтезируют АТФ при росте на глюкозе в аэробных условиях. Авторы обнаружили, что у *T. reesei* экспрессия генов, кодирующих ферменты ЦТК и дыхательной цепи регулируется таким образом, что ПВК окисляется в ЦТК, но не преобразуется в этанол путем брожения. Авторы считали, что существует эволюционное давление, направленное на то, чтобы метаболиты окислялись в процессе дыхания, а не брожения, что привело к развитию аэробного метаболизма в среде с высокими концентрациями глюкозы у *T. reesei*. Работа по геномике привела к идентификации 2385 сиквенсов случайных кДНК и 1151 уникальных транскриптов. Авторы расшифровали геном митохондрий *T. reesei*. Авторы предполагали функции 36% транскриптов, из продуктов которых 3% составляли неизвестные белки. Так, показано, что 61% всех EST не были похожи на сиквенсы в базе данных. По-видимому, они являются специфичными сиквенсами для *T. reesei* и плесневых грибов (Chambergo et al., 2002). Однако, авторы считали, что такую ситуацию можно объяснить тем, что базы данных содержат малое неполное количество сиквенсов грибов, чтобы судить о специфичности сиквенсов при сравнении с данными базы. Установленные EST и экспериментальные процедуры, использованные авторами, можно найти на сайте:

<http://Trichoderma.iq.usp.br/TrEST.html>.

3) Чилаппен с соавторами (Chellappan et al., 2001) в сотрудничестве с компанией Genencor выполняли проект с целью создания базы EST и ВАС для того, чтобы разработать и получить новые генные продукты *T. reesei*. В результате работы были созданы две библиотеки кДНК, одна из которых основана на РНК, экстрагированной из клеток, выращенных в условиях, индуцирующих продукцию целлюлолитических ферментов. Вторая библиотека основана на РНК, экстрагированной из клеток, выращенных при 18 различных условиях. Авторы сиквенировали 9792 EST, из которых 2336 встречались один раз. Избыточность обеих библиотек была одинаковой, тогда как избыточность для полной библиотеки EST выросла до 46%. Данный проект расширил возможность сиквенирования всего генома *T. reesei*.

4) Для изучения биоконтрольного штамма *T. virens* Tv29-8 была создана бактериальная искусственная хромосомная библиотека, превышающая в 25 раз сиквенсы, установленные у *T. virens*. Данная работа, выполненная Кенерли из Университета Техаса, привела к выделению высокомолекулярных фрагментов ДНК, созданию библиотеки ВАС и получению 12243 клонов, содержащих вставки от 10 до 170 kb. Библиотека с успехом применялась для получения полных и усеченных клонов, содержащих пептидсинтазу 62,8 kb и другие гены, кодирующие другие пептидсинтазы, глюкоказы и сигнальные сиквенсы (Wierst et al., 2002).

5) Проект по функциональной геномике был посвящен разработке и использованию генных продуктов антагонистических штаммов *Trichoderma* в различных отраслях промышленности. Проект выполнялся с 2000 года компанией NewBioTechnic (Испания) в сотрудничестве с несколькими научными группами. Целью проекта было использование биологического разнообразия всего рода, а не изучение одного вида. В конце 2002 года работа привела к созданию международного консорциума, финансирование которого осуществлялось 5-й рамочной программой Европейской Комиссии.

6) Проект по функциональной геномике и протеомике антагонистических видов *Trichoderma* для промышленности и сельского хозяйства. Проект был поддержан компанией NewBioTechnic (Испания) и академическими группами стран ЕС. Проект посвящен идентификации генов и их продуктов, имеющих промышленный потенциал с использованием методов функциональной геномики, протеомики и биоинформатики, изучению генетической дивергенции и разработке методов применения грибов. Одной из задач проекта было создание библиотеки уникальных 7000 сиквенсов (Библиотека кДНК), ассоциированных с биоконтролем (http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/cell-factory/volume2/projects/qlk3-2002-02032_en.html).

Для анализа выбрали штаммы из различных экологических и таксономических групп. Из 3 кластеров выбраны 3 штамма, анализируемых в условиях стресса, антагонизма, взаимодействия с растениями и патогенами и служащих источником для создания библиотеки кДНК. Для этого из клеток, находящихся при особом условии, экстрагируется вся РНК. Библиотека кДНК конструируется при помощи бактериальных плазмид. Клеточные клоны выбираются из библиотеки кДНК и сиквенируются с 5' конца, получают 1000 уникальных последовательностей. Сиквенирование и анализ *silico* позволяет провести анализ гомологии, экспрессионный анализ, клонировать полные клоны и провести функциональный анализ отдельных генов.

7) Проект по биологическому контролю заболеваний, вызванных почвенными фитопатогенными грибами (Vegetable Laboratory, USA), 2002 – 2007.

8) Проект по систематике грибов, используемых в биоконтроле из рода *Trichoderma* и *Hypocrea* (Systematic Botany and Mycology Laboratory; USA), 2003-2008.

9) Контроль токсических эндофитных грибов зерновых, овощных и других культур (Russell Research Center Toxicology and Mycotoxin, USA) 2001-2006.

10) Биология, биологический контроль и молекулярная генетика возбудителей заболеваний корней пшеницы и ячменя (Root Disease and Biological Control Research, USA), 2003-2008.

11) Исследования по использованию органических удобрений на основе навоза (Concernation and Production Research Laboratory, Renewable Energy and Manure Management Research, USA), 2000.

12) Систематика биоконтрольных грибов из рода *Trichoderma* и *Hypocrea* (Systematic Botany and Mycology Laboratory; USA, China, France, Австрия), 2003. Получены результаты по исследованию нового вида из Пуэрто Рико на *Stilbohypoxylon Muelleri* – *Hypocrea stilbohypoxyli* и ее анаморфа *Trichoderma koningii*-подобная.

13) Эволюция *Trichoderma harzianum* из ризосферы в пробковую часть растения (University of Missouri-Columbia, USA), 2001.

14) Антагонистическая активность *Talaromyces flavus* и *Trichoderma viride* против *Verticillium albo-atrum* на хмеле (USA), 1999.

- 15) Получение мутантного штамма *Trichoderma Reesei* Mutants, не способного к утилизации глюкозы (USA), 2001 – 2003.
- 16) Супрессия фуманизина В1 с помощью *Fusarium Moliniforme* у *Trichoderma viride* (Systematic Botany and Mycology Laboratory, USA), 1999.
- 17) Защита семян хлопчатника от фитопатогенных грибов (Agricultural Research Service; USA), 2002.
- 18) Использование обработки с помощью *Trichoderma* корней клубники для защиты от *Botrytis*.
- 19) Замена гербицидов, метилброма на микробиологический контроль семян (Southern Weed Science Research; USA), 2000-2005.
- 20) Систематика биоконтрольных грибов рода *Trichoderma* и *Hypocrea* (Systematic Botany and Mycology Laboratory, USA), 2004. Изучается новый эндофитный вид *Trichoderma ovalisporum* для защиты растений кокао (Systematic Botany and Mycology Laboratory; USA), 2004.
- 21) Использование средств биологического контроля для борьбы с насекомыми и сорняками, 2001.
- 22) Биологические, генетические и интегрированные методы контроля фитопатогенных бактерий, грибов и нематод хлопчатника, 2002.
- 23) Соляризация почв, как подход в интегрированной защите от возбудителей фитофтороза корней красной малины (Horticultural Crops Research, USA), 2003.
- 24) Эффект фунгицидов, масла чайного дерева, экстрактов морских водорослей и грибных агентов на возбудителей гнили и урожай клубники (Индия), 2003.
- 25) Болезни шампиньонов в Нигерии.
- 26) Использование изолята Т39 *Trichoderma harzianum* (TRICHODEX) для изучения взаимодействий с листовой поверхностью.
- 27) Поиск грибов биоконтроля (USA), 1998 – 2001.
- 28). Микробное компостирование (Australia), 2000-2003.
- 29). USDA Национальная программа: FY 2000:
 - идентификация и классификация патогенов;
 - биологический контроль;
 - контроль культур;
 - биология, генетика, популяционная динамика и взаимоотношения патогена с векторами хозяина;
 - устойчивость растений к болезням.

Значение развития системы рода *Trichoderma/Hypocrea*

Trichoderma вступила в эру таксономии (когда идентификация проводится уже с использованием анализа ДНК-последовательностей) с небольшим количеством видов, каждый из которых был представлен, верно идентифицированными культурами и, по крайней мере для одного гена каждого вида была задана последовательность. Таким образом, незначительна вероятность того, что новые виды – это описанные ранее. По крайней мере, таксономисты *Trichoderma* не будут обвиняться патологами в изменении названий. Анализ ДНК-последовательностей позволил выявить неправильно идентифицированные виды: многие отчеты в литературе основаны на неверных определениях. В то время как в литературе данный факт ведет к некоторой путанице, конечный результат – это тщательно определенные виды. Например, *T. aureoviride* часто упоминается в связи с биологическим контролем и в экологической литературе. Тем не менее, было установлено, что, несмотря на большое количество описаний, данный вид можно обнаружить лишь в северной Европе (Великобритания и

Нидерланды) и лишь в культурах, выделенных из сумчатых грибов *Hypocrea aureoviridis*. При изучении культуры, идентифицируемой как *T. viride*, найдена более или менее очевидная взаимосвязь между ДНК последовательностями и типом бородавок на конидиях, в зависимости от штамма, что позволило отделению *T. asperellum* от *T. viride*.

Контроль, осуществляемый супрессивными компостами, частично приписывается некоторым более совершенным видам *Trichoderma*. Но вид, найденный в этих ареалах обычно описывается как один из обычных почвенных видов, как *T. harzianum* или *T. hamatum*. Исследователи рассматривают вероятность того, что филогенетически однородные группы могут быть предсказуемы по биологической активности.

Кубичек с сотрудниками обнаружили, что родственный с *T. reesei* (промышленный стандарт при производстве целлюлозы) вид *T. longibrachiatum*, способен к синтезу целлюлаз в более высокой концентрации, чем виды, не входящие в *T. reesei/longibrachiatum* группу. Члены этой группы могут также расти и спороносить при температуре 40⁰С и выделяются из организма людей с нарушениями в иммунной системе: необходимо соблюдать осторожность при использовании *T. longibrachiatum* в биологическом контроле, учитывая тот факт, что при применении или приготовлении биопрепарата существует риск вдыхания спор. Нами также были выделены из почв РТ виды, отнесенные по морфологическим, культуральным и молекулярно-генетическим признакам к *T. longibrachiatum*, ксиланазная и целлюлазная активность которых превышала ферментативную активность *T. reesei* (промышленный аналог, используемый в России для производства цилловиридина). Учитывая эти предварительные результаты наблюдений, можно предсказать некоторую биологическую активность, основанную на филогенетических отношениях.

Несмотря на то, что регуляторные гены трудно выбрать из случайной выборки, нельзя не признать, что интерес к ним возрастает. Почти все отчеты, касающиеся грибов, используемых в биологическом контроле заболеваний, вызываемых другими грибами, относят чаще всего к одному из трех видов *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. virens* и *T. viride*.

Кубичек с сотрудниками (Kubicek et al., 2001) сравнили последовательности ДНК у штаммов, используемых для биологического контроля растений, идентифицируемых, как *T. harzianum*. Половина из 8 исследованных ими штаммов была повторно переопределена. Таким образом, по морфологическим особенностям: определение и распознавание видов представляется проблематичным. Положительная сторона такого недостатка диагностических признаков в том, что описано очень мало видов.

Геном *Trichoderma* представляет собой привлекательное и богатое поле исследования, которое приведет к расшифровке механизмов, представляющих основной интерес в биологии. Особенно интересна сложность биологических взаимодействий, которые данные грибы реализуют при контакте с растениями, животными и микроорганизмами. Кроме того, грибы *Trichoderma* представляют все еще нетронутый источник генов и их продуктов, определяющих развитие новой биотехнологии, целью которой является контроль вредителей, увеличение производства продуктов питания и увеличения их качества, очистка промышленных и природных загрязненных зон, и оборот вторичных материалов, полученных из отходов. Обзор патентов показал, что виды *Trichoderma* чаще других представлены в них не только по сравнению с другими грибами, но и по сравнению с промышленными микроорганизмами. Все возможные подходы, в том числе структурная и функциональная геномика, обеспечивают получение важной информации и полезных продуктов. Установлено, что полезность информации о геноме *Trichoderma* (размер, которого составляет 40 Mb) полностью проявится, когда закончатся первые научные

проекты по сиквенированию, и положение этих грибов среди других будет определено. Более того, трудно найти такое разнообразие микроорганизмов, как грибы рода *Trichoderma*, способных проявлять множество биологически полезных свойств в различных условиях. Установлено значительное количество последовательностей, кодирующих ферменты таких видов, как *T. reesei*. Сравнение их со штаммами *T. harzianum*, используемыми в биологическом контроле, и патогенными *T. aggressivum* позволит повысить эффективность использования данных грибов.

Trichoderma представляет собой прекрасный объект для проекта по функциональной геномике для идентификации и использования генов, экспрессирующихся в процессе взаимодействия с растениями и с фитопатогенами, при культивировании в условиях, индуцирующих или подавляющих продукцию промышленных ферментов или биомассы, при утилизации полифенолов, углеводов, пестицидов и других поллютантов, метаболизируемых данными грибами в качестве субстратов. Более того, путем выделения белков методом двумерного электрофореза можно выявить протеом *Trichoderma* при атаке патогена. Гены, определяющие синтез вторичных метаболитов, представляют особый интерес. Разработаны новые средства для изучения транскриптома и совмещения с протеомом для лучшего понимания функционирования генома. Методы, разработанные для *T. reesei*, можно применить для изучения других видов *Trichoderma* (Rautio et al., 2006). Несомненно, в будущем будут проведены генетические исследования видов рода *Trichoderma* для увеличения использования полезных свойств этих грибов в индустрии для развития науки.

Применение генетических методов для изучения сложных механизмов, позволяющих грибам *Trichoderma* продуцировать большие количества трансгенных белков, контролировать патогены и воздействовать на метаболизм и физиологию растений, проблемы, связанные с таксономическим определением разных видов и штаммов внутри рода все еще находятся в зародышевом состоянии. К настоящему времени получено немного результатов, несмотря на потребность в таких данных, точно обозначенных во многих структурных и функциональных генетических проектах, выполнение которых привело ко многим инновациям. С помощью методов, использованных для изучения биоконтроля и усиления роста растений, в результате применения штаммов *Trichoderma* установлено, что сотни отдельных генов участвуют в регуляции процессов микопаразитизма, антибиоза, в обеспечении конкуренции за субстраты и за пространство. Множество генов обеспечивают толерантность к стрессу путем усиления роста корней и растений, индукцию резистентности растений и кодируют систему инактивации ферментов патогенов. Некоторые гены идентифицированы, патентованы и используются как трансгены для увеличения резистентности растений, но большинство генов никак не используется в биотехнологии.

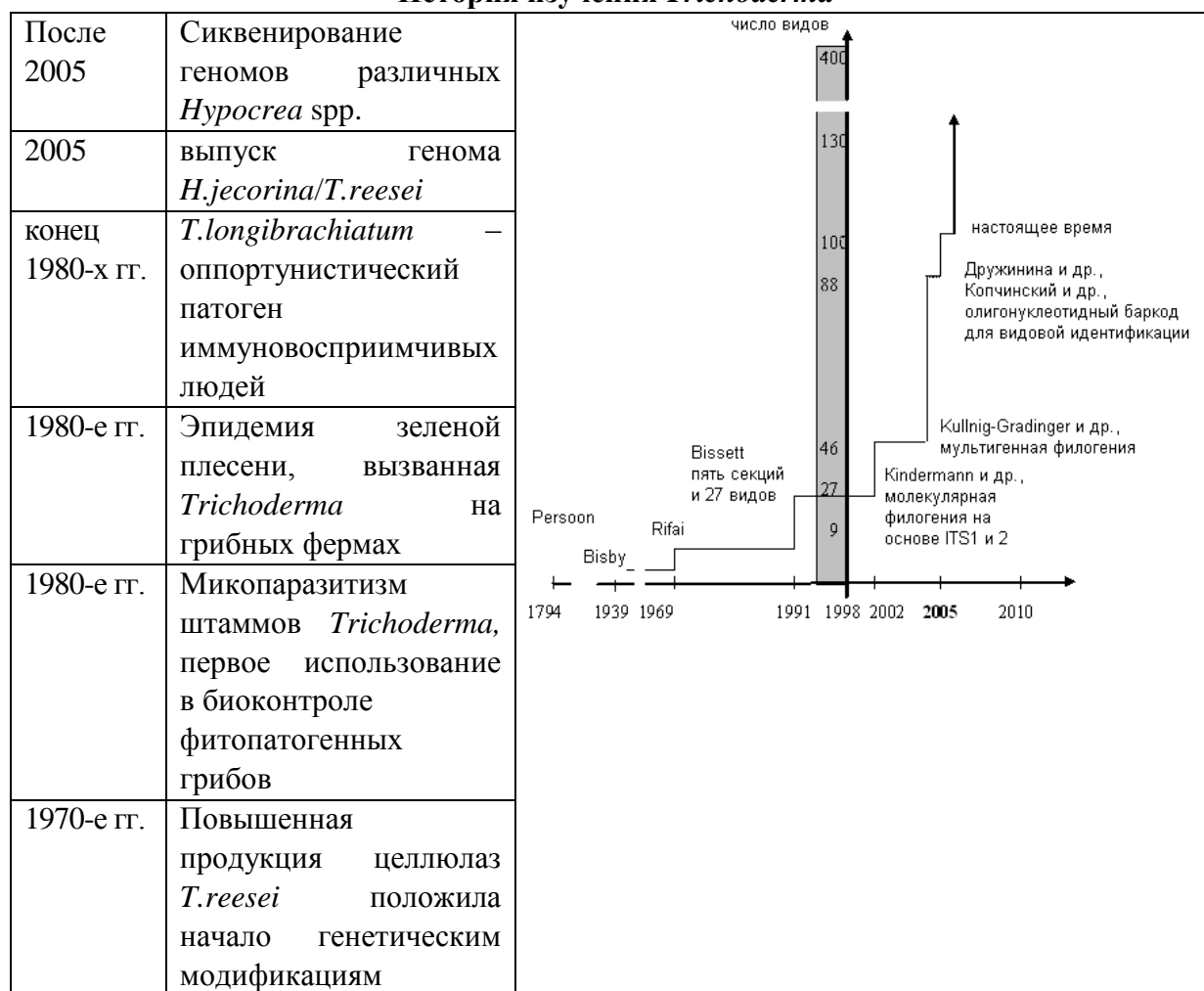
На сегодняшний день по состоянию современной информации, *Trichoderma* размещают среди грибных родов наиболее изученных таксономически. Несмотря на то, что недавно идентифицировали и филогенетически подтвердили около 100 видов, их эволюция и филогенетические отношения все еще трудно решаются (табл. 1.5). Возможно, на ситуацию влияет отсутствие известных предков (как в ситуации с многими другими грибами) или же высокое селекционное давление в течение эволюции на эти таксоны последовательно приводящих к дихотомическому разветвленному дереву.

По мнению же Витебро (Viterbo et al., 2002) в отношении *Trichoderma*, несмотря на то, что грибы этого рода имеют биотехнологическое значение, геном изучен недостаточно, по сравнению с другими организмами. Такая ситуация, по его мнению, создалась из-за значительной дивергентности видов и отсутствия оптимизированной системы для их исследования, а также из-за большого количества и разнообразия генов,

экспрессия которых происходит при разных условиях среды. Становится ясно, что следует использовать не только фенотип *Trichoderma* и биоконтрольную активность, но всю генетическую систему данных грибов. Благодаря современным методам исследования, информация о геноме грибов *Trichoderma* представлена в базе данных. Анализ ДНК последовательности позволил нам увидеть взаимосвязь видов через формацию филогенетического древа. Учитывая эти предварительные результаты наблюдений, можно предсказать некоторую биологическую активность, основанную на филогенетических отношениях. Темпы раскрытия филогенеза *Trichoderma* значительны. Исходя из филогенетической системы взглядов, разумным представляется выяснить, имеют ли филогенетическую основу некоторые виды с высокой биологической активностью, такой, как синтез хитиназ или способность к прямому паразитизму на других грибах. К сожалению, в данном направлении не было сделано сколько-нибудь существенных попыток.

Т а б л и ц а 1.5

История изучения *Trichoderma*



Новые виды *Trichoderma* будут найдены по мере изучения новых областей, к тому же филогенетическая теория видов становится все более востребованной, что закономерно, так как все большее число людей пользуются ДНК-последовательностью, а также базой данных ГенБанка и новыми программами. Исследование эндофитных грибов с позиций перспектив биологического контроля, особенно наряду с изучением районов с большим разнообразием взаимодействий хозяев и патогенов, гарантирует выявление новых или более эффективных биорегулирующих агентов и не только среди представителей рода *Trichoderma*. Изучение взаимодействия между растением-хозяином и его эндофитами, особенно на молекулярном уровне, конечно же, дает

возможность по-новому взглянуть на устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым грибами-фитопатогенами (Александрова, 1999).

Для всех исследованных видов *Trichoderma*, несомненно, в будущем будет доказана принадлежность к роду *Hypocrea*, а не к анаморфным грибам. Однако современные исследования системы *Fungi* показали, что невозможно идентифицировать виды *Hypocrea* до тех пор, пока не будет установлен анаморф *Trichoderma*.

Таким образом, перспективы использования *Trichoderma* могут быть впечатляющими.

1.2. Общая морфологическая характеристика *Trichoderma/Hypocrea*

Полное систематическое положение *Trichoderma* на основном древе живых организмов описывается как: клеточный организм *Eukaryota*; группа *Fungi/Mandazoa*; *Fungi*; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Sordariomycandes*; *Hypocreomycandidae*; *Hypocreales*; *Mitosporic*, *Hypocreales*.

TRICHODERMA Persoon:Fr.

Номенклатура:

Trichoderma Persoon, *Römer's Neues Mag. Bot.*, **1**: 92. 1794; Fries, *Syst. mycol.* **1**: xlv. 1821 and *Syst. mycol.* **3**: 214. 1829.

Aleurisma Link, *Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berl.* **3**: 19. 1809.

Aleurisma Link: Fr., *Syst. mycol.* **1**: xlv, 1821; *Syst. mycol.* **3**: 452. 1832 (non Link:Fr. sensu Vuillemin, *Bull. Séanc. Soc. Sci. Nancy*, III, **12**: 153. 1911 (= *Chrysosporium* Corda).

Sporoderma Mont., *Syll. Gen. Sp. crypt.* p. 291. 1856 (teste Höhnelt, 1910).

Pachybasium Sacc., *Rev. Mycol.* **7**: 160. 1885.

Pyreniopsis O. Kuntze, *Revis. Gen. Pl.* **3**(3): 508. 1898.

Лектотип: *T. lignorum* (Tode) harz переописан Clements, Shear (1931), не используемое в настоящее время имя, которое теперь приписывают грибам вида *T. viride* Pers.: Fr.

Синонимы рода *Trichoderma*:

Aleurisma Link, *Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berl.* **3**: 19. 1809.

Aleurisma Link: Fr., *Syst. mycol.* **1**: xlv, 1821; *Syst. mycol.* **3**: 452. 1832 (non Link:Fr. sensu Vuillemin, *Bull. Seanc. Soc. Sci. Nancy*, III, **12**: 153. 1911 (= *Chrysosporium* Corda).

Sporoderma Mont., *Syll. Gen. Sp. crypt.* p. 291. 1856 (teste Höhnelt, 1910).

Pachybasium Sacc., *Rev. Mycol.* **7**: 160. 1885.

Pyreniopsis O. Kuntze, *Revis. Gen. Pl.* **3**(3): 508. 1898.

Половая стадия *Trichoderma* (анаморфа) представлена аскомицетом *Hypocrea* (телеоморфа).

Из известных в настоящее время трех классов анаморфных мицелиальных грибов, *Trichoderma* относят к *Huiphomycetes* (мицелиальные формы, образующие конидиальные спороношения свободно, а не внутри или на поверхности каких-либо структур).

Морфологическая характеристика *Trichoderma*

Члены рода *Hypocrea* и его анаморфа *Trichoderma* являются типичными представителями влажных лесов всех типов (Druzhinina et al., 2004). Эти грибы легко

определяются благодаря их яркой окраске. Большинство представительных видов рода *Hypomyces* (Fr.) (*Hypocreaceae*) паразитируют на культурных и съедобных грибах. Виды *Hypocrea* и его анаморфа *Trichoderma* Pers. часто встречаются не только во влажных тропических и субтропических лесах, но также в аридных умеренных и северных зонах и даже в более экстремальных нишах – на крайнем севере и крайнем юге. Телеоморфы *Hypocrea* можно обнаружить на древесине, на мицелии других членов *Ascomycota*, на живых базидиомицетах, на съедобных грибах на разных стадиях гниения, реже они встречаются на травяных субстратах. Типичные *Hypocrea* формируют морщинистую, яркоокрашенную или неокрашенную плотную стромату, диаметр которой превышает 5 мм, хотя некоторые виды образуют строматы скорее палочковидные, овоидные несколько сантиметров в размере. Род *Hypocrea* обычно характеризуется тем, что виды формируют перитеции, окруженные плотными строматами, которые состоят из псевдопаренхимы или уплотненных гифов. Виды *Hypocrea* образуют 8 аскоспор с одной перетяжкой, находящихся в одной оболочке на ранних этапах развития. Аскоспоры бесцветные или зеленые, рано распадаются на две округлые, яйцевидные, вытянутые или клиновидные аскоспоры, часто не одинаковые по форме. Таким образом, сумки содержат 16 аскоспор.

Обычно виды *Trichoderma* выделяют из почвы, хотя они часто спорулируют на древесине, на шляпках культурных грибов, на лесных грибах, где их можно определить с легкостью по массе конидий, окрашенных в зеленый цвет, реже в белый и желтый цвета. Они обнаружены в разных местообитаниях. Например, грибы можно обнаружить на влажных стенах зданий, как эндофиты, в стволах деревьев влажного тропического леса. *Trichoderma* составляет значительную часть биомассы грибов почвы.

Основные морфологические признаки *Trichoderma*:

1) признаки колоний, которые могут быть различными и характерными для каждого вида (однако внешний вид колоний довольно трудно описать с точностью, необходимой для идентификации);

2) темпы роста культуры на различных средах при различных температурах могут оказаться значимыми при различении видов, сходных по другим характеристикам;

3) образование конидий из разросшихся конидиофор, либо из конидиофор, сгруппированных в грозди или пустулы, является характерным признаком у видов;

4) диффузный пигмент также можно назвать характерным признаком, хотя цвет таких пигментов в случае с *Trichoderma* слабо варьируется. Штаммы, относящиеся к секции *Longibrachiatum*, обычно обладают заметным ярким зеленовато-желтым пигментом, во всяком случае, после того, как выделены впервые. Тусклые зеленоватые оттенки характерны для многих видов, но не являются отличительными признаками. Некоторые виды, напротив, лучше всего характеризуются через полное отсутствие пигмента, в то время как красноватые оттенки можно наблюдать у нескольких изолятов;

5) характерные кристаллы, образующиеся в среде, наблюдаются лишь у *Trichoderma aureoviride*;

6) едва различимые запахи плесени и затхлости обычно присущи различным штаммам *Trichoderma*. Характерные ароматы, напоминающие запах кокоса, обычно вырабатываются штаммами *Trichoderma viride* и иногда также *Trichoderma atroviride*;

7) тип разветвления и объединение конидиофор в грозди и пустулы являются важными признаками для идентификации штаммов *Trichoderma* по группам и видовым совокупностям;

7а) скученные пустулы характерны для многих видов из секции *Pachybasium*, хотя также встречаются и у многих штаммов других групп;

7б) разветвление конидиофор может быть правильно мутовчатым или более

беспорядочным. Разветвления бывают широкими и прямыми или соответственно узкими и изогнутыми;

7в) верхушка конидиофор некоторых видов из группы *Pachybasium* может заканчиваться стерильным отростком, который бывает следующих типов: прямой, извитый и спиралевидный;

8) признаки фиалид:

8а) фиалиды могут располагаться в правильных мутовках, быть сдвоенными, чередующимися или менее правильно расположенными;

8б) форма фиалид – характерный признак для группы; фиалиды – типично короткие и округлые в секции *Pachybasium*, в то время как в секции *Longibrachiatum* они продолговатые и часто почти цилиндрической формы;

8в) терминальные фиалиды у многих видов часто более продолговатые и более узкие, во многих случаях могут быть и шиловидные;

9) субтерминальные клетки конидиофор могут образовывать конидии через короткое, боковое горлышко, по определению Gams (1971), – афанофиалиды, которые часто встречаются у *Trichoderma* в секции *Longibrachiatum*;

10) форма конидий может быть различной – от сферической до эллиптической. Обнаружена *Trichoderma* с яйцевидными или короткоцилиндрическими конидиями, с базальной основой, более или менее конусообразной и усеченной. Число возможных вариаций размеров конидий у *Trichoderma* невелико, тем не менее, родственные виды часто могут быть дифференцированы по значимым отличиям в размерах;

11) согласно исследованиям с помощью оптического микроскопа, поверхность конидий у большинства видов гладкая, однако, при изучении некоторых видов сканирующим электронным микроскопом (SEM) с явно гладкими конидиями обнаруживается, что они слабо орнаментированы. Существуют также варианты шероховатых и бородавчатых конидий в агрегатах *T. viride*, а также в двух видах *T. saturnisporum* и *T. ghanense*. Конидии могут быть пузырчатые или иметь выступы внешней стенки;

12) пигментация конидий тоже является характеристикой с вариациями – от бесцветной (в большинстве случаев белой) до различных оттенков зеленого, реже серого или коричневого. У некоторых видов зрелая конидия при изучении через микроскоп имеет темно-зеленый цвет, в других видах только бледный;

13) хламидоспоры характерны для многих видов, хотя не все виды образуют хламидоспоры на среде CMD при 20°C в течение 10 дней. Чаще всего у большинства видов они сферические или эллипсоидные, термальные и интеркалярные, гладкостенные, бесцветные, желтоватые или зеленоватые, 6-15 μm в диаметре. У грибов *T. stromaticum*, кроме типичных хламидоспор, образуются шарообразные хламидоспоры внутри клеток. Вид *T. virens* отличается тем, что в чистой культуре образует большое количество хламидоспор. Растущие гифы имеют лишь небольшое количество признаков, значимых для идентификации. Хламидоспоры у таких видов, как, например, *T. stromaticum* могут быть многоклеточными;

14) синанаморфы обычно образуются у некоторых видов, которые формируют типичные пустулы. Синанаморфы выявляют по одиночному типу конидиофора, который имеет *Verticillium* тип ветвления и конидии которого находятся в капле жидкости светло-зеленого цвета на концах каждой фиалиды.

На образование конидий влияют разные типы стресса. Мексиканские ученые установили, что конидиогенез *Trichoderma atroviride* индуцируется повреждением мицелия (Hernandez-Onate, Herrera-Estrella, 2006). Другие исследователи изучали влияние pH окружающей среды на образование конидий видов рода *Trichoderma* (Steyaert et al., 2006).

Глава 2. Метаболиты *Trichoderma*

Изучение метаболизма *Trichoderma* в опытах *in vivo* и *in vitro* позволило выявить целый спектр метаболитов: ферменты, кислоты, факторы роста и др.

2.1. Литические ферменты *Trichoderma*

Сокращения:

nt	нуклеотид;
GlcNAc	NAG – N-ацетил- β -D-глюкозамин;
фермент NAG	N-ацетил- β -d-глюкозаминидаза;
CWDE	ферменты, разрушающие клеточную стенку;
MAC	мембраноатакующий комплекс;
PR-protein	белок патогенезиса;
DMI	ингибитор деметилирования стеролов;
MW	относительная молекулярная масса;
CBH	целлюбиогидролаза (экзоглюканазы);
CBD	целлюлозосвязывающая область;
TIM	триозофосфат изомераза;
CBM	углевод-связывающий модуль;
ИЭТ	изоэлектрическая точка;
PCR	полимеразная цепная реакция.

Ферменты, секретируемые *Trichoderma*, характеризуются сложностью состава. Есть данные о способности у диких штаммов к секреции: эндохитиназ, хитобиозидаз, β -N-ацетилгексозаминидаз, N-ацетил- β -галактозаминидаз, β -1,3-глюкозаз, β -1,6-глюканаз, протеаз, ДНаз, α -амилаз, целлюлаз, липаз, маннаназ, ксиланаз, уреаз, РНКаз, пектиназ, пектинлиаз, лакказ, пероксидаз и мутаназ (Ait-Lahsen et al., 2001; Lorito, 1998; Viterbo et al., 2001; 2002).

Способность *Trichoderma* синтезировать такие CWDE, как хитинолитические, целлюлолитические и глюканолитические ферменты, была описана уже несколько лет назад (Soriente et al., 2006). Большинство штаммов *Trichoderma* описано в научной литературе в качестве потенциальных антагонистов растений или в качестве целлюлолитиков и гемицеллюлолитиков. Хитиназы и глюканазы чаще исследовались в плане их способности к деструкции клеточной стенки грибов, хотя другие энзимы, деградирующие клеточную стенку, такие как протеазы, липазы и фосфатазы, могут также быть вовлечены в этот процесс (Lorito, 1998).

Большинство видов *Trichoderma* – сапротрофы. Обычно грибы *Trichoderma* колонизируют лиственный опад и мульчу. Для успешного размножения достаточно 1% углерода в субстрате. В природных условиях они потребляют многие полимерные субстраты, среди которых преобладают целлюлоза (Lynd et al., 2002) и гемицеллюлоза.

Цепи целлюлозы – это β -1,4-глюкозидные гомополимеры, включающие около 8000-12000 глюкозных единиц, которые соединены водородными связями, формирующими практически нерастворимую кристаллическую структуру (Koivula et al., 1998). Большое разнообразие целлюлолитических ферментов эффективно секретируется в культуральную среду и синергически осуществляет растворение высококристаллической нативной целлюлозы (Sanz et al., 2004, 2005).

Главная особенность гемицеллюлозы – это ее гетерополисахаридный состав, который базируется на главной цепи, образованной ксилозой или маннозой и содержащей боковые цепочки заместителей, таких как арабиноза и галактоза, уксусная и глюкуроновая кислоты. Пектины обычно содержат больше различных разветвленных

структур. В отличие от деградации целлюлозы, ведущей к образованию глюкозы и глюкоолигомеров, деградация гемицеллюлоз ведет к накоплению различных моно- и дисахаридов в разных пропорциях, в зависимости от типа гемицеллюлоз. Другие полимеры, такие, как β -глюкан, крахмал и протеин, содержат лишь небольшую часть доступного углерода, хотя они могут и преобладать в отдельных случаях (Donzelli et al., 2005).

Полная деградация целлюлозы и гемицеллюлозы требует большого числа внеклеточных энзимов, которые поэтому имеют промышленный интерес (Melander et al., 2005). Требуются исследования биохимических свойств трехмерной белковой структуры и возможности выделения кодирующих генов этих ферментов. Сэнз с соавторами (Sanz et al., 2004) изучали экстрацеллюлярные литические ферменты *Trichoderma*. Для характеристики полиморфизма между 5 предполагаемыми изоферментными активностями [β -1,3-глюканаза (ЕС 3.2.1.39, ЕС 3.2.1.58), β -1,6-глюканаза (ЕС 3.2.1.75), целлюлаза (ЕС 3.2.1.4; ЕС 3.2.1.21, ЕС 3.2.1.91), хитиназа (ЕС 3.2.1.30, ЕС 3.2.1.52), протеаза (ЕС 3.4.11; ЕС 3.4.13–19; ЕС 3.4.21–24, ЕС 3.4.99)] они использовали 18 штаммов из трех секций *Trichoderma*. Из них семь штаммов были из *T. sect. Pachybasium*, девять из *T. sect. Trichoderma* и два из *T. sect. Longibrachiatum*. Авторы определили 37 различных аллелей: 13 для β -1,3-глюканазы, 4 для β -1,6-глюканазы, 3 для целлюлазы, 8 для хитиназы и 9 для протеазной активности. В следующей работе была изучена экзо- α -1,3-глюканаза, а именно AGN13.2, *T. asperellum* T32 (ЕС 3.2.1.59, ферменты, способные к деградации 1,3-глюканов, также называют мутаназами). Ферменты были очищены, охарактеризованы, ген клонирован (табл. 2.1) (Kubicek, Penttilä, 1998).

Т а б л и ц а 2.1

Гены целлюлаз *Trichoderma*

Целлюлаза	Штамм	Ген
Целлобиогидролаза I	<i>T. reesei</i>	<i>cbh1</i>
	<i>T. viride</i>	<i>cbh1</i>
	<i>T. koningii</i>	<i>cbh1</i>
Целлобиогидролаза II	<i>T. reesei</i>	<i>cbh2</i>
Эндо- β -1,4-Глюканаза I	<i>T. reesei</i>	<i>egl1</i>
	<i>T. longibrachiatum</i>	<i>egl1</i>
Эндо- β -1,4-Глюканаза II	<i>T. reesei</i>	<i>egl2</i>
Эндо- β -1,4-Глюканаза III	<i>T. reesei</i>	<i>egl3</i>
Эндо- β -1,4-Глюканаза IV	<i>T. reesei</i>	<i>egl4</i>
Эндо- β -1,4-Глюканаза V	<i>T. reesei</i>	<i>egl5</i>
Глюкозидаза I	<i>T. reesei</i>	<i>bgl1</i>

2.1.1. Характеристика целлюлазного комплекса *Trichoderma*

Все целлюлазы имеют одинаковую химическую специфичность к 1,4-гликозидным связям, но они отличаются отношением к субстратам. Традиционно их разделяют по механизму действия на экзоглюканазы и эндоглюканазы (Ahmed et al., 2005). Экзоглюканазы, или целлобиогидролазы (1,4- β -D-глюкан целлобиогидролаза,

ЕС 3.2.1.91), отщепляющие целлобиозу с конца полисахаридной цепи, обычно имеют высокую активность к кристаллической целлюлозе. *T. reesei* синтезирует две целлобиогидролазы: СВНI, атакующая целлюлозную цепь с ее редуцирующего конца и СВНII, атакующая целлюлозную цепь с ее нередуцирующего конца (рис. 2.1). Эндоглюканазы (EG) (1,4-β-D-глюкан-4-глюканогидролаза, ЕС 3.2.1.4) осуществляют разрыв цепи посередине, таким образом, производя новые концы цепей для воздействия целлобиогидролаз (Miettinen-Oinonen et al., 2005).

Эндоглюканазы предпочитают аморфные участки целлюлозы и, в отличие от целлобиогидролаз, способны гидролизовать замещенную целлюлозу, например, карбоксиметилцеллюлозу и гидроксиметилцеллюлозу. Наконец, β-глюкозидаза расщепляет целлобиозу и другие растворимые полисахариды до глюкозы, что является важнейшим шагом, так как целлобиоза является конечным продуктом и ингибитором многих целлюлаз (Miettinen-Oinonen et al., 2005).

Взаимодействие генной инженерии и структурной биологии в настоящее время лежит в основе значительных успехов в понимании основных механизмов целлюлазной активности. Ахмед с соавторами (Ahmed et al., 2005) выделили гены ферментов целлюлазного комплекса: экзоглюканазы (ЕС. 3.2.1.91), эндоглюканазы (ЕС. 3.2.1.4), β-глюкозидазы из *Trichoderma harzianum* E-58 и изучили с помощью RTPCR. Амплифицированные и очищенные продукты были встроены в сайт SmaI плазмиды pUC18.

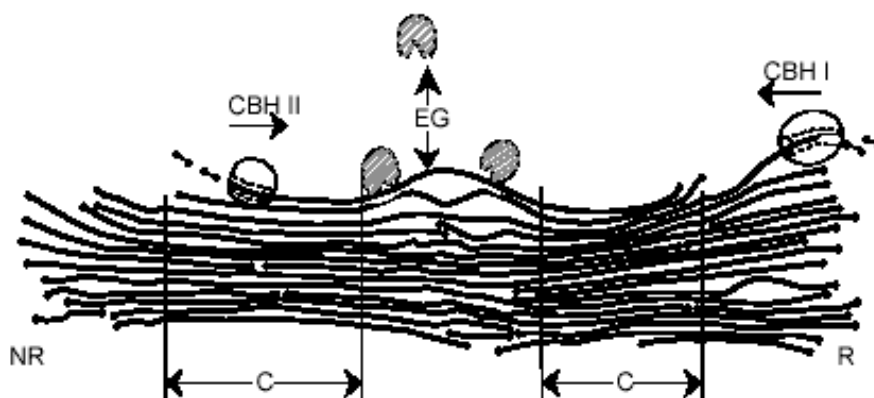


Рис. 2.1. Механизм ферментного гидролиза целлюлозы.

Две целлобиогидролазы (СВН) атакуют высокоупорядоченные кристаллические области (С) с противоположных концов цепи, эндоглюканаза (EG) – по середине самого неупорядоченного района. R-редуцирующийся конец, NR-нередуцирующийся конец (рис. адаптирован из Miettinen-Oinonen et al., 2005).

Плазмиды, содержащие гены *exg*, *egl* и *bgl*, были трансформированы в *E. coli* для дальнейшей характеристики. Максимальная активность выделенных Ахмедом с соавторами (Ahmed et al., 2005) целлюлаз (экзоглюканаз (ЕС; 3.2.1.91), эндоглюканаз (ЕС. 3.2.1.4), β-глюкозидаз) из *Trichoderma harzianum* E-58 составила 2.764, 14.4 и 0.629 IU mL⁻¹, соответственно.

Многие гидролазы гриба являются модулярными белками, содержащими в себе каталитическую область и углевод-связывающий модуль (СВМ) (Sandgren et al., 2005; Miettinen-Oinonen et al., 2005). Это длинная аминокислотная последовательность в пределах активного центра фермента, конфигурация которого обеспечивает углевод-связывающую активность (Bourne, Henrissat, 2001). СВМ ранее был классифицирован как целлюлозосвязывающая область СВД (Koivula et al., 1998; Miettinen-Oinonen et al., 2005). Проведенные ранее исследования дают основания полагать, что каталитический домен имеет форму эллипсоидной головки (рис. 2.2), а линкер принимает вытянутую

конформацию между каталитическим доменом и CBD (CBM). Структуры выделенных каталитических и целлюлозосвязывающих доменов многих грибных и бактериальных целлюлаз успешно определены (Koivula et al., 1998).

Для выделения и идентификации целлюлолитических ферментов давно и широко применяются иммунологические методы. Антитела, в особенности моноклональные, оказались чрезвычайно полезным инструментом и при изучении роли постсекреционного протеолиза в образовании множественных форм целлюлаз. Однако получение моноклональных антител, в особенности доменспецифических, сопряжено со значительными трудностями. Гернер с соавторами (Гернер и др., 2000) предложен более простой метод получения препарата антител, специфичных к некаталитической части целлюлогидролазы I *Trichoderma reesei*, из поликлональной антисыворотки к полноразмерному нативному ферменту.

Строение каталитического домена целлюлаз

На основании последовательности СВМ выделены семейства, пронумерованные арабскими цифрами (Bourne, Henrissat, 2001). Было отмечено 39 семейств, из них, по крайней мере, 13 относились к целлюлазам. Семейства целлюлаз часто содержат и экзо- и эндогликоканазы, и в дополнение к целлюлазам некоторые семейства содержат другие ферменты, например, ксиланазы, маннаназы и декстриназы (Henrissat, Bairoch, 1996).

Кристаллическая структура каталитических доменов СВНII и EGI определена, также известно о кристаллизации EGI *T. reesei*. Возможно энзиматическое получение кристаллизованных доменов целлюлазы I (Hayashia et al., 2005).

Первой на атомном уровне была описана кристаллическая структура каталитического домена целлюлазы *T. reesei* СВНII, принадлежащего к 6 семейству. Полипептид сворачивается в α/β -структуры подобно триозофосфат изомеразе (TIM), но содержит вместо восьми семь β -цепей (рис. 2.3).

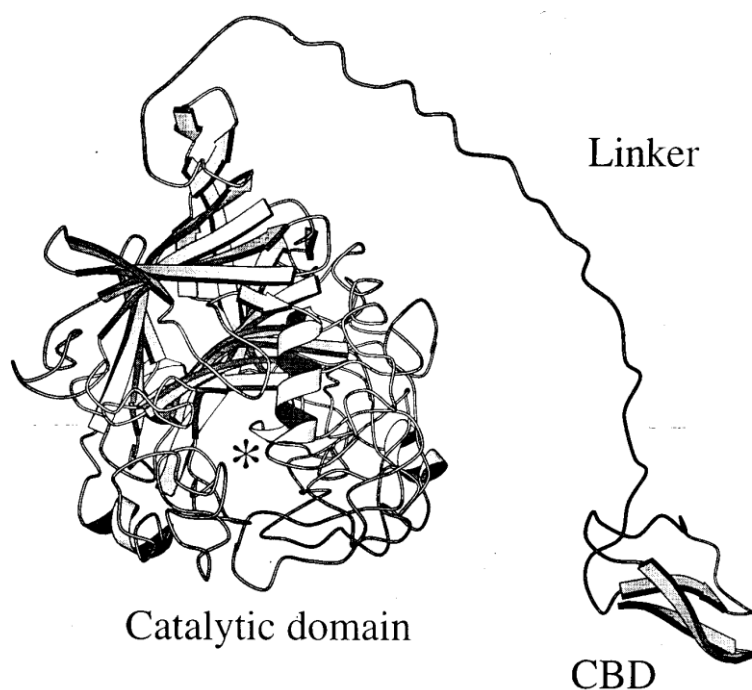
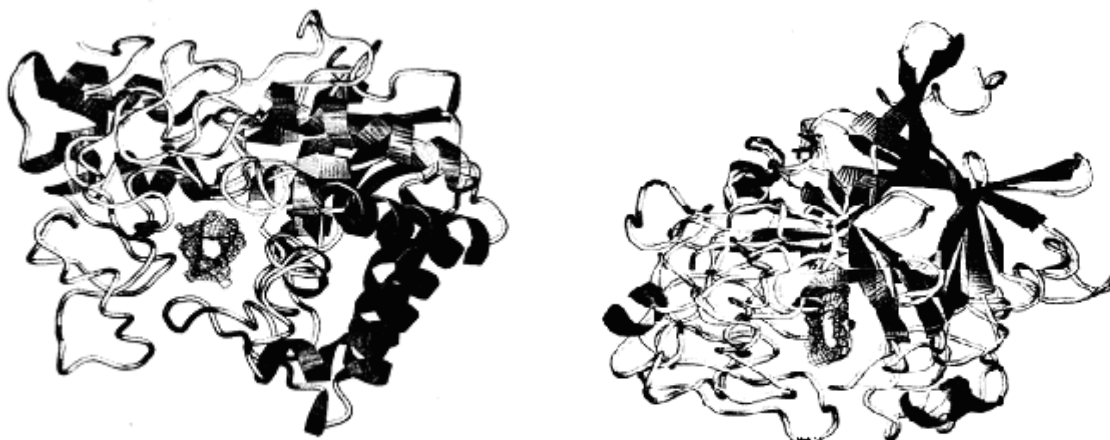


Рис. 2.2. Схема структуры интактной области СВНII *T. reesei*, полученная с помощью программы Molscript Kraulis (1991). Местоположение активного участка туннеля обозначено звездочкой. Линкерный пептид смоделирован для иллюстрации физической связи двух функциональных областей (рис. адаптирован из Koivula et al., 1998).



А

В

Рис. 2.3. Схема общей структуры и активного участка туннелей каталитических доменов *T. reesei* (А) и (В). Вторичная структура окрашена темно-серым цветом, β -цепи представлены стрелками, α -спирали – спиралями. Для обоих белков показаны активные сайты туннелей, представленные поперечным сечением их гидрофильных поверхностей (рис. адаптирован из Koivula et al., 1998).

Активная полость СВНII локализована в туннеле, образованном двумя поверхностями, стабилизированными дисульфидными мостиками. Туннель длиной 20Å проходит через весь каталитический домен и способен вместить одну целлюлозную цепь, входящую с его конца. Эндоглюканазы 6 семейства имеют сквозной туннель, проходящий через активную зону каталитического центра. Это позволяет эндоцеллюлазе при сходной структуре активного центра осуществлять разрыв связи в середине целлюлозных цепей, в то время как экзоглюканазы могут работать только с концами целлюлозных цепей с длиной, равной глубине туннеля в активной зоне (цит. по Koivula et al., 1998).

Кристаллическая структура каталитического домена СВНI *T. reesei* содержит длинный туннель в активной зоне. Эндоглюканаза EGI из *T. reesei* имеет также более открытую активную зону, подтверждая главное различие в строении экзо- и эндоглюканаз.

При сравнении трехмерных структур гликозилгидролаз обнаружено, что их активные зоны можно разделить на три главных класса независимо от механизма катализа или пространственной структуры фермента. Активная зона в виде кармана или кратера характерна для таких ферментов, как β -глюкозидаза, глюкоамилаза и β -амилаза, которые гидролизуют моносахариды с конца углевода. Этот тип активного центра не является оптимальным для таких субстратов, как нативная кристаллическая целлюлоза, которая содержит несколько доступных концов цепей. Вероятно, оптимальным для этих целей является протяженная активная зона, связывающая большое число остатков моносахаров. Одним из вариантов является активная зона, скрытая в туннеле, как показано выше для СВНI и СВНII *T. reesei* и также для некоторых бактериальных целлобиогидролаз. В другом варианте более короткие петли, формирующие активную зону, образуют впадину на поверхности фермента. Этот открытый активный центр связывает полисахаридную цепь на длинном участке, такой механизм обнаружен у эндо-активных ферментов, таких, как α -амилаза, эндоцеллюлаза, ксиланаза (Koivula et al., 1998).

Строение активного центра целлюлаз *T. reesei*

Комплексная структура СВНII *T. reesei* с несколькими разными лигандами имеет четыре связывающие зоны внутри активного центра туннеля. Хотя субзоны в целом сходны, они имеют разное окружение. В субзонах -2, +1 и +2 триптофан содержится в цепях W135, W367 и W269, соответственно, что имеет большое значение для формирования сахарид-связывающей зоны (рис. 2.4). В зоне -2 это приводит к сужению туннеля. Кроме триптофана активный центр туннеля содержит много остатков, которые образуют водородные связи с субстратом.

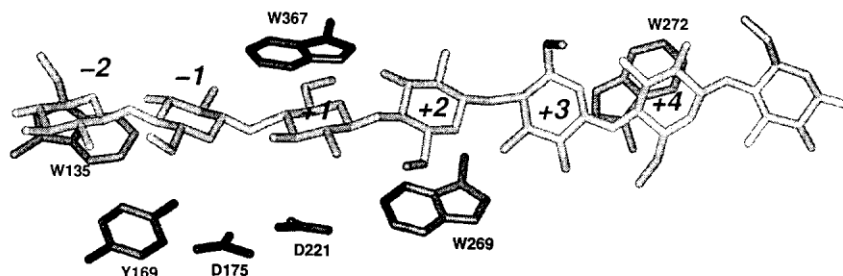


Рис. 2.4. Активный центр туннеля СВНII *T. reesei* с молекулой целлогептозы. Нередуцирующий конец субстрата связывается с субзоной -2, и происходит разрыв между субзонами -1 и +1. D221 действует в качестве донора в реакции, поскольку D175, очевидно, влияет на восстановленное состояние D221. Y169, вероятно, взаимодействует с остатком сахаров в области -1 и с D175. Гидрофобные стэкинг-взаимодействия между боковой цепью триптофана и сахарным остатком характерны для субзон -2, +1, +2, +4. (рис. адаптирован из Koivula et al., 1998).

В большинстве этих взаимодействий вовлечены заряженные остатки. Активный центр туннеля СВНI длиной примерно 50Å сформирован четырьмя петлями, частично стабилизированными дисульфидными мостиками. Активный центр СВНI, подобно СВНII, способен вместить, по крайней мере, семь глюкозных единиц цепи глюкоана и имеет сужение в центре, которое вызывает искривления в цепи. Связывание остатков глюкозы осуществляется водородными связями в четырех субзонах, содержащих триптофановые остатки W376, W367, W38 и W40 (Koivula et al., 1998).

Гидролиз гликозидных связей целлобиогидролазами *T. reesei*

Целлобиогидролазы, как все гликозидазы, катализируют гидролиз гликозидных связей по принципу кислотного катализа. В реакцию вовлекаются два необходимых для катализа карбоксила, донор протона и нуклеофил, который обычно располагается на противоположной стороне. В зависимости от окружения этих двух остатков, в результате гидролиза могут возникнуть разные конфигурации углерода C₁ (рис.2.5). СВНI *T. reesei*, в отличие от СВНII, является вместе с глюкоамилазой инвертирующей гликозидазой (Koivula et al., 1998).

Остатки, которые потенциально могут быть вовлечены в процесс связывания субстрата и катализ, могут быть определены из трехмерной структуры энзима и проверены экспериментально химической модификацией и/или сайт-направленным мутагенезом. 2-дезоксиглюкоза и целлобиоза успешно использованы в качестве ингибиторов, которые ковалентно связываются с нуклеофилом в энзимах. Определение структуры целлюлаз *T. reesei* и других целлюлаз открывает путь к детальному изучению их реакционных механизмов (Koivula et al., 1998).

Исходя из того, что СВНII является инвертирующим ферментом, в процесс гидролиза вовлекается кислота, дающая протон и основание для участия в нуклеофильной атаке воды (рис. 2.5). Активный центр инвертирующих гликозидаз построен так, что молекула воды размещается между основанием и аномерным углеродом. Две аспарагиновые кислоты, D221 и D175, были обнаружены в центре активной зоны туннеля СВН II между субзонами -1 и +1 и очень близко расположены к

О-гликозидной связи (рис. 2.4). Однако эти два остатка располагаются на одной и той же стороне разорванной связи на расстоянии водородной связи между собой. D221 находится в среде, в которой будет восстановлен, в отличие от D175, который скорее всего будет окислен. Мутация D221A уничтожала практически всю каталитическую активность СВНП к малым растворимым олигосахаридам, но не влияла на эффективность связывания малых лигандов. Мутация D175A существенно уменьшала каталитическую активность СВНП и немного изменяла процесс связывания. D175A-мутанты демонстрировали остаточную активность 2% к растворимым полимерным субстратам, тогда как D221A были полностью неактивны. Таким образом, это позволило предположить, что D221 действует в качестве донора протона, вследствие этого D175 может способствовать восстановлению D221 и стабилизации реакционных интермедиатов (Koivula et al., 1998).

Активный центр СВНП также содержит третий карбоксилат, D401, который четко направлен на действие в качестве каталитического основания, но связан ионной связью с двумя ближайшими остатками R353 и K395. Таким образом, если D401 участвует в катализе, он, вероятно, действует как относительно слабое основание. Однако некоторые современные кинетические исследования подвергли сомнению этот классический однозамещенный механизм для СВНП, полагая, что основание в реакции вовсе не обязательно. В частности, гидролиз α -целлобиозил фторида СВНП не кажется процессом, продолжающимся по этому типу механизма реакции. Это контрастирует с эндоглюканазой А из *Cellulomonas fimi*, также принадлежащей семейству 6, которая показала типичный инвертирующий механизм с вовлечением и кислотного, и основного катализа. Таким образом, эндоглюканазы и экзоглюканазы 6 семейства могут следовать различным механизмам (Koivula et al., 1998).

Гидрофобные стэкинг-взаимодействия ароматических остатков важны для обеспечения высокой аффинности к полисахаридным субстратам в каталитическом и в субстрат-связывающем доменах. В активном центре СВНП такие стэкинг-взаимодействия в субзонах -2, +1 и +2 и предполагаемом сайте связывания +4 обеспечивают триптофановые остатки. При замене индольного кольца триптофанового остатка W135 в субзоне -2 фенольным кольцом (мутант W135F) наблюдалось снижение связывания малых лигандов и последующее уменьшение каталитической активности СВНП (Koivula et al., 1998).

Полагают, что действие инвертирующих и неинвертирующих ферментов сопровождается переходным состоянием, а при действии некоторых гидролаз изменение кольца при переходном состоянии происходит уже при связывании субстрата. В активном центре СВНП изменение кольца предположительно происходит в области -1, предшествуя разрыву связи (рис. 2.4). Эта субзона разительно отличается от остальных связывающих сайтов отсутствием связывающего сахара триптофана и наличием выступа, который допускает альтернативную конформацию сахара (Koivula et al., 1998).

Тирозиновый остаток Y169 строго консервативен в 6 семействе и является частью субзоны -1 СВНП. Его ОН-группа находится на расстоянии водородной связи от метилгидроксила кольца глюкозы и от карбоксила D175. Роль Y169 изучена путем введения мутации (Y169F), изменяющей взаимодействие ОН-группы. Мутант показал частичное снижение каталитической активности, но при этом значительно возросла константа ассоциации к малым растворимым лигандам. В случае использования метилумбеллиферил-целлобиозида (MeUmb(Glc)₂) Y169F-мутант показал увеличение аффинности в 50 раз по сравнению с диким типом СВНП. Схожий эффект показан для дикого типа СВНП при использовании другого лиганда – MeUmbGlcXyl. Предполагая, что данный лиганд связывается с СВНП подобно MeUmb(Glc)₂, субзона -1 занята остатком ксилозы, у которой отсутствует метилгидроксил, присутствующий в соответствующем глюкозном остатке. Полагают, что эти изменения указывают на конформационное искажение углеводного кольца, которое может быть ослаблено

путем перемещения взаимодействующей группы из лиганда, как в случае с ксилозой, или из фермента, как в случае с Y169F-мутантом (Koivula et al., 1998).

Кроме изучения свойств целлюлаз, исследователей продолжает интересовать механизм регулирования синтеза этих энзимов. Исследования регуляции приносят понимание физиологии организма и роли грибов в круговороте углерода в природе. Они помогут увеличить производство ферментов, получить новые сверхпродукты целлюлаз и гемицеллюлаз (Koivula et al., 1998; Ward, 2006).

Существующие данные местами достаточно противоречивы. Часть разногласий в литературе вызвана использованием мутантных штаммов или различием в культуральных условиях. Например, несколько исследований было проделано со штаммом Rut C-30 *T. reesei*, который, как было показано, является мутантом с репрессированным катаболизмом углерода. Поэтому этот обзор фокусирован на описании сообщений, в которых синтез индивидуальных ферментов контролировался, по меньшей мере, на уровне белка и, предпочтительно, на уровне мРНК (Koivula et al., 1998).

Хильден с соавторами (Hildén et al., 2005) оценили обработку эндоглюканазами Cel5A *Trichoderma reesei* и *Aspergillus* sp. (Novozym 476TM из Novozyme A/S) поверхности волокон древесины твердых и мягких пород. Кривая времени гидролиза согласовалась с моделью двухфазной деградации, описанной для биэкспоненциальной функции. Кинетические параметры согласовались с быстро и медленно разлагающимися частями субстрата. Полученные свойства бумаги показали корреляцию с кинетическими ферментными параметрами. Флуоресцентная метка группировок редуцирующегося конца волокон, сопровождающая обработку ферментом, показала, что класс «быстрых» субстратов соответствует комплексу целлюлоз со свободными концами цепей, слабосвязанных с основной массой целлюлозы. Корреляция между параметрами ферментной кинетики и механических свойств бумаги, полученной из соответствующей массы, должна позволить получать быструю оценку грубоволокнистых материалов, используемых для производства бумаги.

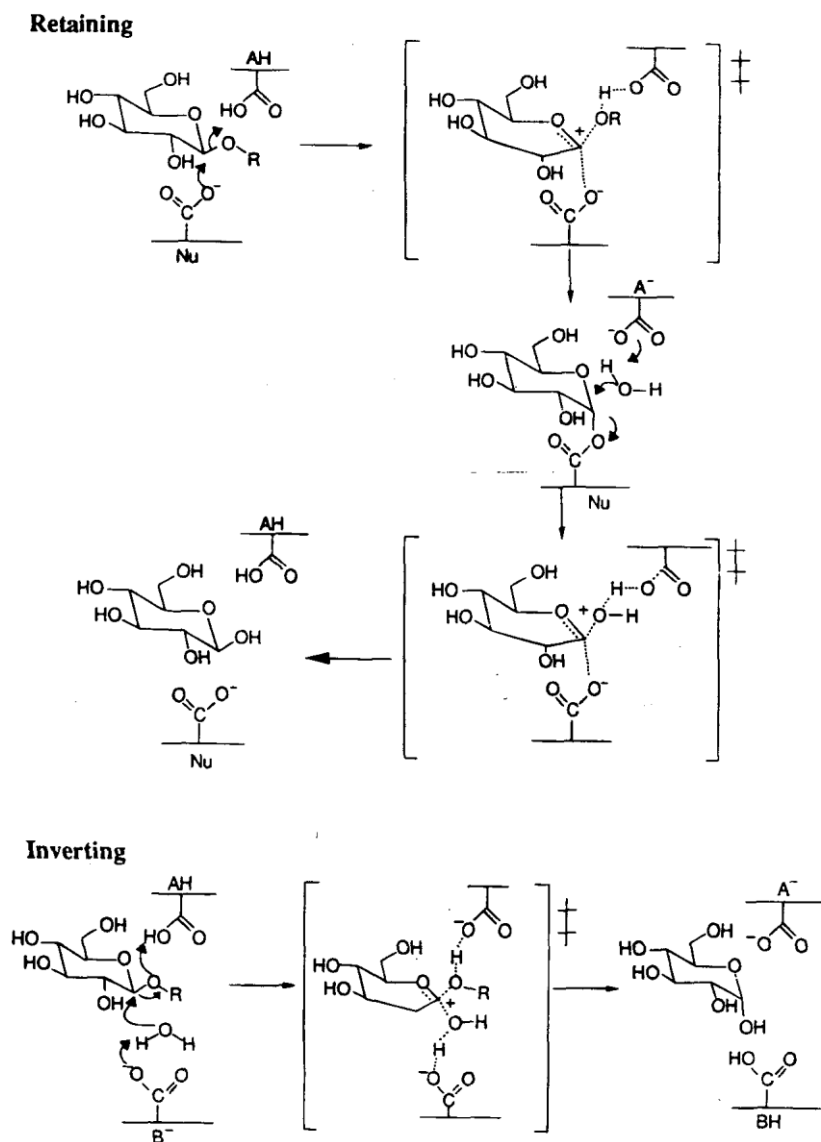


Рис. 2.5. Схема двух разных каталитических механизмов гликозидных гидролаз. Ферменты, не меняющие конфигурации, используют механизм двойного замещения. На первом этапе кислотный катализатор (AH) отдает протон на гликозидный кислород, в то время как нуклеофил (Nu) перемещает гликозидный O4-кислород отходящей группы. Углерод гликозид-ферментного интермедиата на этом этапе находится в инвертированном состоянии. На втором этапе замещения вода гидролизует гликозид-ферментный интермедиат, возвращая углероду исходную конфигурацию. Ферменты, влияющие на конфигурацию, используют механизм одинарного замещения, который включает кислотный донор (AH) протона на гликозидный кислород и основание, способствующее нуклеофильной атаке воды. Предложенное переходное состояние показано в квадратных скобках и отмечено ‡ (рис. адаптирован из Koivula et al., 1998).

2.1.1.1. Регуляция экспрессии целлюлазы

Условия индукции

Многие ранние работы описывали культуральные условия для продукции целлюлаз. Активная продукция целлюлаз проявляется, когда грибы культивируются на среде, содержащей целлюлозу или смеси растительных полимеров. Так же β -глюкан и разные ксиланы вызывают экспрессию. В дополнение к этому чистые олигосахариды, такие, как целлобиоза, целлобиано-1,5-лактон, лактоза и софороза, как сообщается, вызывают продукцию целлюлаз (Foreman et al., 2003; Mach, Zeilinger, 2003). Многие природные потенциальные индукторы, включая полимеры целлюлозы, не могут

проникнуть в грибную клетку, таким образом, представляется, что олигосахариды или их производные, выделившиеся из полимеров, служат действующими компонентами, преумножающими экспрессию целлюлаз.

В отличие от глюкозы, глицерин и сорбитол не репрессируют и не индуцируют образование целлюлаз и могут, таким образом, рассматриваться как нейтральные источники углерода по отношению к экспрессии гена целлюлаз. Добавление в культуральную среду 2-4 мМ софорозы или ксилобиозы вызывает индукцию синтеза целлюлаз (Kubicek, Penttilä, 1998).

Результатом совместного действия целлюлаз является образование из целлюлазы целлобиозы – основного растворимого продукта. Ее появление может быть сигналом, говорящим о присутствии экстрацеллюлярной целлюлозы, и может рассматриваться в качестве возможного индуктора целлюлаз. Однако добавление целлобиозы к культуре *Trichoderma reesei*, растущей на целлюлозе скорее ингибирует, чем стимулирует образование целлюлазы. Это, вероятно, результат гидролиза целлобиозы до глюкозы, которая репрессирует образование целлюлазы, и эффект целлобиозы, таким образом, может зависеть от активности β -глюкана. Таким образом, путь к получению целлюлаз при культивировании гриба на целлобиозе в количествах, сопоставимых при культивировании на целлюлозе, лежит через ингибирование β -глюкозидазы. Таким образом, метаболизм целлобиозы является критической точкой, от которой зависит, сможет ли целлобиоза быть индуктором, и это может происходить лишь, когда гидролиз целлобиозы до глюкозы идет медленно (Kubicek, Penttilä, 1998).

Софороза, вызывающая высокий уровень образования целлюлаз и не поддающаяся действию β -глюкозидазы, является отличным индуктором целлюлаз. Генетическое подтверждение этому было получено с помощью рекомбинантного штамма, у которого ген β -глюкозидазы (*bgl1*) был разрушен. Соответствующие результаты были получены также с использованием ингибиторов целлобиогидролаз. Добавка софорозы к среде восстанавливает индукцию целлюлаз и рост на целлюлозе (Kubicek, Penttilä, 1998).

Транспорт целлобиозы, софорозы, гентиобиозы и ламинарибиозы в мицелии *Trichoderma reesei* осуществляется β -сахаридпермеазой, обладающей высоким сродством к этим субстратам, большим чем β -глюкозидаза, но с меньшей активностью. Это означает, что при низкой концентрации дисахаридов связывание превалирует над гидролизом, и ситуация меняется на обратную при возрастании содержания целлобиозы (Kubicek, Penttilä, 1998).

Основываясь на приведенных выше заключениях, можно предположить, что скорость гидролиза производных целлюлозы β -глюкозидазой определяет индукцию целлюлаз. Штаммы *Trichoderma reesei* проявляют возрастание β -глюкозидазной активности не только при индукции целлюлозой, но и софорозой (Kubicek, Penttilä, 1998).

В исследованиях по получению целлюлаз, применяемых для заключительной обработки хлопковой ткани, созданы пять типов штаммов суперпродуцентов целлобиогидролаз: суперпродуценты СВНІ, содержащие и не содержащие эндоглюканазу I (EGI), суперпродуценты СВНІІ, содержащие и не содержащие эндоглюканазу II (EGII), и штаммы суперпродуценты СВНІ и СВНІІ, не содержащие эндоглюканы I и II. Одна дополнительная копия гена *cbh1* увеличивала продукцию белка СВНІ в 1.3 раза, а две копии – в 1.5 раза. Уровень общей секреции белков возрастал у СВНІ-трансформантов по сравнению с исходным штаммом. Одна копия кассеты с геном *cbh2*, который экспрессировался под промотером *cbh1*, увеличивала продукцию белка СВНІІ в три-четыре раза по сравнению с исходным штаммом. Сконструированы штаммы *T. reesei*, продуцирующие повышенный уровень СВНІ и СВНІІ, не содержащие EGI и EGII, путем перемещения локуса *egl1* с кодирующей областью гена *cbh1* и локуса *egl2* с кодирующей областью гена *cbh2*. Ген *cbh1*

экспрессировался под своим собственным промотером, а *cbh2* – под промотерами обоих генов. Продукция белка СВНІ СВН-трансформантами возросла в 1.6 раза, а продукция белка СВНІІ в 3.4 раза по сравнению с исходным штаммом. Примерно похожее количество белка СВНІІ продуцировалось с использованием *cbh1* и *cbh2* промотеров. При использовании ферментного препарата с повышенным содержанием СВНІІ для заключительной обработки хлопковой ткани показано лучшее удаление волосков и лучший внешний вид по сравнению с применением препарата дикого типа (Miettinen-Oinonen et al., 2005).

Индукция целлюлаз на уровне транскрипции

Впервые клонированный ген целлюлазы *Trichoderma reesei* методом дифференциальной гибридизации показал, что регуляция синтеза целлюлаз происходит на уровне транскрипции, и несколько исследований, основанных на Northern-анализе, подтвердили это. Эта транскрипционная регуляция является основным механизмом (цит. по Kubicek, Penttilä, 1998).

В экспериментах, проведенных в последнее время, определено, что экспрессия генов различных целлюлаз координирована, и это выражается в том, что их относительный уровень экспрессии приблизительно одинаков при всех условиях индукции.

cbh1 – наиболее экспрессируемый ген, за ним следует *cbh2* и *egl1*. Удивительно высок уровень экспрессии *egl5*. Регуляция гена предполагаемой мембранной эндонуклеазы *cel5b* отличается от других эндонуклеаз. Ген *egl1*, кодирующий β-глюкозидазу-I, экспрессируется на значительно более низком уровне, чем другие целлюлазы. Поведение *egl3* менее изучено. Показано, что его координированная с другими генами целлюлаз транскрипция меньше при индукции сахарозой (Nogawa et al., 2001).

Координированная экспрессия показана также в экспериментах с культурами *Trichoderma reesei* с удаленными генами целлюлаз. Штаммы продуцировали все другие транскрипты целлюлаз, кроме удаленных со сходной кинетикой при росте на лактозе (Foreman et al., 2003). С другой стороны, при изучении изогенных штаммов показано, что делеция *cbh1* вызывает нарастание *cbh2*-фермента, в отличие от необнаруженного соответствующего эффекта у штаммов, мутантных по *egl1* или *egl2*. В последующих экспериментах сообщается о том, что такого рода регуляция *cbh2* проявляется как на лактозе, так и на целлюлозе в качестве источника углерода.

Возможно, что промотор *cbh1* является фактором транскрипции *cbh2*, для подтверждения необходим более детальный анализ (Kubicek, Penttilä, 1998).

Некоторые ранние данные об исследованиях мутантных штаммов содержат информацию о независимости регулирования β-глюкозидазы, целлобиогидролазы и эндоглюканызы. В дополнение к этому, мутантный штамм *Trichoderma reesei* с неактивными генами целлюлаз, не способный расти на целлюлозе, не индуцируемый софорозой и целлюлозой, синтезирует целлюлазы на лактозе (Kubicek, Penttilä, 1998).

Изучался уровень экспрессии основных генов целлюлаз при росте грибов на среде с неограниченным источником углерода, или на нейтральных источниках – сорбитол или глицерол, с добавлением софорозы в мМолях или других дисахаридов. Уровень экспрессии при культивации на целлюлозной среде на качалке в течение 15 часов после добавки сахарозы был очень высокий. м-РНК могут быть обнаружены уже через 30 минут после добавки софорозы, но значительные уровни м-РНК наблюдаются несколько позже и продолжают возрастать, по крайней мере, 48 часов после добавки софорозы. Лактоза и целлобиоза провоцируют уровень экспрессии в колбах на качалке, который был до этой добавки ниже в 50 раз. Интересно, что именно лактоза, но не галактоза провоцирует экспрессию целлюлаз. Продукция целлюлазы явно уменьшалась при культивировании *T. reesei* на растительных гидролизатах,

богатых L-арабинозой (гидролизаты овсяной шелухи и сахарной свеклы) по сравнению с ростом на лактозе (Xiong et al., 2005). При культивировании *Trichoderma harzianum* E-58 на среде с различными источниками углерода максимальная продукция экзоглюназы, эндоглюназы и β -глюкозидазы была достигнута при 28°C, pH 5.5 и постоянном перемешивании 120 rpm в течение 5 дней (Ahmed et al., 2000).

Ощутимо увеличивают уровень экспрессии генов целлюлаз разные ксиланы и ксилобиаза (Ordaz-Ortiz, Saulnier, 2005). Интересны результаты роста на арабитоле, сопоставимые по экспрессии с культивированием на лактозе.

В дополнение к регуляции источника углерода другие факторы, такие, как pH или концентрация азота, могут регулировать экспрессию целлюлаз. Например, для целлюлазы *Trichoderma reesei* QM-9414 показан оптимум при pH 4.5 (Krishna et al., 2000).

С другой стороны, изучение роли митохондриальной активности в синтезе целлюлаз позволило предположить, что снижение уровня растворенного кислорода до 0,15 мг/л вызывает уменьшение транскрипции целлюлаз.

Ранние сообщения позволяют считать, что грибы продуцируют низкий уровень целлюлаз конститутивно при любых способах культивирования, даже на глюкозе. Это должно позволить осуществить первичную атаку целлюлозы и освобождение олигосахаридов, которые могут быть индукторами более масштабного синтеза целлюлаз. Эта гипотеза позднее была развита с использованием таких чувствительных инструментов, как антитела и экспрессионный анализ. Результаты всех работ подтверждают наличие в культуральной среде низкого уровня целлюлаз, синтезированных в процессе роста на репрессирующей среде с источником углерода глюкозой (цит. по Kubicek, Penttilä, 1998).

Весьма значительная экспрессия целлюлаз может быть получена в результате снижения содержания глюкозы в культуральной среде без добавки каких-либо прочих индукторов. Эта сильная дерепрессия после уменьшения содержания глюкозы отмечается для всех целлюлаз, включая β -глюкозидазу I, кодирующуюся *egl1*. Эффект репрессии/дерепрессии, описанный выше для глюкозы, также отмечен для некоторых других моносахаридов, которые быстро метаболизируются, например: галактоза, фруктоза, мальтоза. Экспрессия после истощения источника углерода описывается и у мутантов *Trichoderma reesei*, описанных выше, чья целлюлазная система не индуцируется с софорозой или целлюлазой, но функционирует при росте на лактозе (Kubicek, Penttilä, 1998).

Известно, что при росте в средах, содержащих полисахариды, клеточные стенки или автоклавированный грибной мицелий, *T. harzianum* секретируют β -1,3-глюканызы, обладающие литической и антимицотической активностью против фитопатогенов (Ait-Lahsen et al., 2001). Нозерн и Вестерн-блот анализы показали, что индукция β -1,3-глюканызы коррелирует с антагонизмом. Авторы полагают, что данный фермент участвует в антагонизме грибов.

Роль целлюлаз, связанных с конидиями

Конидии *Trichoderma reesei* содержат целый ряд энзимов, способных гидролизовать широкий круг различных полисахаридов и прочих соединений. Конидиальные целлюлазы могут служить альтернативой для деградации целлюлазы в условиях питательного дефицита. Они сосредоточены на поверхностях конидий. Иммунологический анализ показал присутствие СВН I и СВН II, но не EGI на поверхности конидий. Целлюлазная система конидий способна гидролизовать кристаллическую целлюлозу. Основываясь на иммунологическом анализе, обнаружено относительно высокое содержание СВН II. Около 60% белка составляло СВН I, содержание СВН II – лишь 15-20%, содержание СВН II на поверхности конидий было примерно в 2 раза больше СВН I. Возможно, высокий уровень СВН II приводит к более

эффективной начальной атаке кристаллической целлюлозы: оптимальное отношение для гидролиза целлюлозы СВНІ:СВНІІ = 1:2 (Kubicek, Penttilä, 1998).

Важность СВНІІ и некоторых других целлюлаз в иницировании роста *Trichoderma reesei* на целлюлозе была исследована с использованием изогенных штаммов, в которых основные гены целлюлаз были замещены генами *Aspergillus nidulans ams*. Описаны различия в способности к росту на кристаллической целлюлозе в качестве единственного источника углерода. Штаммы, в которых СВНІІ и EGLІІ удалены, росли хуже штаммов с удаленными EGLІ, которые росли нормально. Конидии штаммов с удаленными СВНІ и СВНІІ почти не могли расти на целлюлозе. Рост на целлюлозе этих штаммов коррелировал с уровнем экспрессии оставшихся генов целлюлоз. Добавление 2 мМ сахарозы к культурам этих штаммов с удаленными СВНІ и СВНІІ индуцировала транскрипцию EGLІ и EGLІІ и восстанавливала способность атаковать целлюлозу. Эти результаты соответствуют механизму, согласно которому целлюлазы, связанные с конидиями, могут иницировать деградацию молекул целлюлозы, генерируя индукторы биосинтеза целлюлаз, и ведут к росту на целлюлозе (Kubicek, Penttilä, 1998).

Репрессия целлюлаз глюкозой

Факты проявления механизма репрессии глюкозой экспрессии целлюлаз являются хорошо известными (Ahmed et al., 2000). Действительно, экспрессия в целом подавляется глюкозой, но это не всегда может быть глюкозная репрессия, возможно, это вызвано исчезновением индуктора. Однако в присутствии высокого уровня глюкозы софороза не может индуцировать синтез целлюлаз, тогда как на средах с «нейтральными» источниками углерода – глицерин, сорбитол – она нормально индуцирует целлюлазы. Добавка глюкозы в культуральную среду всегда ведет к исчезновению транскрипции *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* и *egl5* целлюлаз. Как отмечалось ранее, такой же эффект может дать исчезновение индуктора. Тем не менее, есть все основания полагать, что механизм репрессии глюкозы сильно влияет на экспрессию целлюлаз.

Проявление направленной репрессии в экспрессии целлюлаз глюкозы получено из анализа промоторов целлюлаз и из клонирования гена, кодирующего основной репрессор катаболизма углерода – белок CREI. Гены *cre1 Trichoderma reesei* и *Trichoderma harzianum* были клонированы. Два гена *Trichoderma*, кодирующие белки, показали идентичность на 93% на аминокислотном уровне. Гены *cre1*, гомологичные гену *Aspergillus creA*, хорошо изученному регулятору репрессии основного катаболизма углерода, изученные на генетическом и молекулярном уровнях. Сравнение CREA/ CRE I белков *Trichoderma* и *Aspergillus* показало идентичность лишь на 46%. Все репрессоры идентичны в области содержащегося в них цинка. Также аналогичную область содержит репрессор MigI, дрожжи *S. cerevisiae* и некоторые другие дрожжи (Kubicek, Penttilä, 1998).

Эксперименты, проведенные с *Aspergillus* и *Trichoderma*, показали, что CRE A и CREI имеют нуклеотидную последовательность, сходную с дрожжами. Однако предполагается, что CREI исполняет роль не только репрессора глюкозы. К удивлению, было отмечено, что его экспрессия на средах с целлюлозой выше, чем на глюкозной среде. Объяснение этого факта требует дополнительных исследований (Kubicek, Penttilä, 1998).

Часто используемый штамм *Trichoderma reesei* Rut-30 мутирован по гену *cre1*. Этот штамм содержит лишь 20% кодирующего региона. Rut-30 был изолирован, как штамм гиперпродуцент целлюлаз, при скрининге на рост на целлобиозе в присутствии 2-диоксиглюкозы. Northern-анализ подтвердил, что этот штамм продуцирует целлюлазы в присутствии глюкозы. Эта дерепрессия, вызванная мутацией *cre1-1*, может быть устранена пересадкой гена *cre1* от данных штаммов. Таким образом, подтверждается,

что глюкозный репрессор *cre1* вовлечен в регуляцию целлюлазы. Однако остается неизвестным, является ли он лишь регулятором репрессии глюкозы (Kubicek, Penttilä, 1998).

Анализ функциональных областей промоторов целлюлазных генов

Сравнение последовательностей *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* *Trichoderma reesei* и генов других *Trichoderma* обнаруживает согласованные последовательности. Однако лишь некоторые из них изучены. Необходимо заметить, что определение регуляторных регионов путем сравнения последовательностей, что само по себе затруднительно, не может быть гарантией реальной регуляции экспрессии генов (Kubicek, Penttilä, 1998).

Промотор целлобиогидролазы I. Промотор содержит участок связывания белка глюкозного репрессора CREA/Mig1. Аналогичные данные получены о гене *Aspergillus*.

Исследования промотера показали, что CREI не единственный регулятор и для полной экспрессии требуются активаторы.

Промотор целлобиогидролазы II. При изучении промотера *cbh2* *Trichoderma reesei* обнаружен специфический комплекс ДНК-белок, присутствовавший только в мицелии, индуцированном софорозой. Показано, что фрагмент промотера *cbh2* связывает CREI, синтезированный *E. coli in vitro* (Kubicek, Penttilä, 1998).

2.1.2. Характеристика ксиланазного комплекса *Trichoderma*

Штаммы рода *Trichoderma*, являющиеся лучшими продуцентами целлюлаз, также являются эффективными продуцентами других типов гидролаз полисахаридов, включая целую серию гемицеллюлолитических ферментов. Эти энзимы гидролизуют нецеллюлозные растительные полисахариды, которые называют «гемицеллюлозы» и которые находятся в растительной клеточной стенке в тесном взаимодействии с целлюлозой (цит. по Biely, Tenkanen, 1998).

Строение ксилана

Гемицеллюлозы являются гетерополисахаридами, состоящими из двух или более моносахаридов, таких как D-ксилоза, L-арабиноза, D-глюкоза, D-манноза, D-галактоза и 4-О-метил-D-глюкуроновая кислота. Некоторые из них этерифицированы уксусной, феруловой и р-кумаровой кислотами. Структура гемицеллюлоз зависит от источника и может различаться даже между различными тканями одного растения. Часто две или три разных гемицеллюлозы встречаются в образцах одного растения, но в различных пропорциях (Biely, Tenkanen, 1998).

Основным компонентом гемицеллюлоз лиственной древесины является О-ацетил-4-О-метил-глюкуроно-D-ксилан и минимально содержится глюкоманнан. Основным компонентом гемицеллюлоз хвойной древесины является О-ацетил-D-галакто-D-глюко-D-маннан. Следующей распространенной гемицеллюлозой хвойных является L-арабино-D-глюкуроно-D-ксилан, который в отличие от ксилана лиственных пород не ацетилирован. Минорные гемицеллюлозы, содержащиеся в древесине, представляют разные типы галактанов и арабиногалактанов (древесина лиственницы). Наиболее распространенной гемицеллюлозой зерновых и трав являются арабиноксиланы (Biely, Tenkanen, 1998).

На рисунке 2.6 представлен гипотетический фрагмент растительного ксилана, показывающий основные структурные особенности этой группы. Скелет каждого ксилана построен из D-ксилопиранозных остатков с β -1,4-связью. Ксилопиранозные остатки случайным образом соединены с α -1,2-связанной 4-О-метил-D-глюкуроновой кислотой и α -1,3-связанной L-арабинофуранозой. В ксиланах зерновых один

ксилопиранозный остаток может нести два α -L-арабинофуранозных заместителя в положениях 2 и 3. Глюкуроноксиланы древесины твердых пород частично ацетилированы. В зерновых арабиноглюкуроноксиланы, построенные из более 10% L-арабинофуранозных остатков, этерифицированы в 5 положении феруловой или p-кумаровой кислотами (Biely, Tenkanen, 1998).

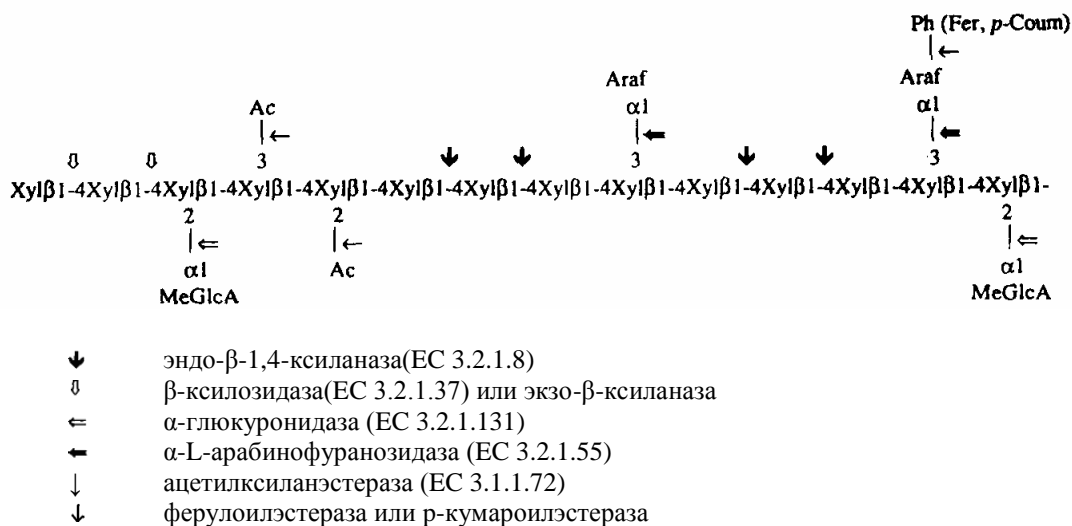


Рис. 2.6. Гипотетический растительный ксилан и ферменты его полного гидролиза (рис. адаптирован из Biely and Tenkanen, 1998).

Ишихара (Ishihara, 1997, цит. по Biely, Tenkanen, 1998) показал, что продуктами гидролиза ксиланов древесины, предварительно восстановленных до 4-О-метилглюкуроноксилана при 40⁰С в течение 24 ч ферментом β -ксилазой (фракция II) *Trichoderma viride*, являются ксилоза, ксилобиоза, ксилотриоза, ксилотетроза и ксилопентоза.

Характеристика ксиланазного комплекса *Trichoderma*

Ксиланазы – ферменты, гидролизующие полимерные цепочки ксиланов, относят по международной классификации ферментов к гликозидазам – ферментам гидролиза гликозидов, ди-, три-, и полисахаридов (табл. 2.2). Все ксиланазы являются двухкомпонентными ферментами, они содержат белковую и углеводную составляющие. Для полного гидролиза ксилана необходимо участие следующих ферментов: эндоксилаза EC3.2.1.8, экзоксилаза EC3.2.1.37, β -D-ксилозидаза EC3.2.1.37, α -L-арабинофуранозидаза EC 3.2.1.55 (цит. по Biely and Tenkanen, 1998).

По Кобосу (Cobos, 2003) ксиланазный комплекс *Trichoderma reesei*, включает β -ксилозидазу и два основных фермента: кислую ксиланазу XYN1 с молекулярной массой 19 кДа, рН ~ 5.2, и рН_{opt} 4.0 и щелочную ксиланазу XYN2 с молекулярной массой 20-21 кДа, рН > 9.0, и рН_{opt} 5.0-5.5.

Гены ксиланаз

Ген/ фермент	Число сиквенсов в базах данных
Xyl1 (α -ксиланаза)	2
Xyl2 (α -ксиланаза)	2
Xyl3 (α -ксиланаза)	1
Эндо- α -1,4-ксиланаза	1
α -глюкуронидаза	1
α -L-арабинофуранозидаза	1

Основным ферментом, деполимеризующим ксилан, является эндо- β -1,4-ксиланаза. Этот фермент расщепляет главным образом основную цепь. Остальные ферменты работают синергично с ксиланазой. Они атакуют полимерный ксилан, создавая новые сайты для ксиланазы, или действуют на линейные и замещенные олигосахариды, освобожденные ксиланазой. Штаммы рода *Trichoderma* известны как продуценты практически всех ксиланолитических ферментов, представленных на рисунке 2.6. Многочисленные ферменты очищены и охарактеризованы, их гены выделены и сиквенированы. Три ксиланазы *Trichoderma* кристаллизованы, и определена их третичная структура. В группе ферментов, гидролизующих стенки растительных клеток, ксиланолитические системы штаммов *Trichoderma*, главным образом *T. reesei*, являются наиболее охарактеризованными (табл. 2.3) (Biely, Tenkanen, 1998).

Эндо- β -1,4-ксилазы

Виды *Trichoderma*, продуцирующие многочисленные ксиланазы (*T. harzianum*, *T. koningii*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei* и *T. viride*), можно разделить на три группы (табл. 2.3). Некоторые штаммы продуцируют ксиланазы с низкой молекулярной массой 18-23 kDa, другие – ксиланазы с более высокой молекулярной массой 29-33 kDa. Оба эти типа ксиланаз являются специфическими, т.е. не гидролизуют целлюлозу. Ксилан-деполимеризующие ферменты массой 53-57 kDa относятся к неспецифическим эндо- β -1,4-глюканазам. Наиболее изучена эндоглюканаза EGI из *T. reesei*. Ксиланазы продуцируются при росте гриба на целлюлозе и ксилане или индуцируются ксилобиозой, а EGI продуцируется только при росте на целлюлозе или при индуцировании софорозой (Biely, Tenkanen, 1998).

Разделение ксиланаз *Trichoderma* по молекулярной массе и значению pH хорошо согласуется с классификацией гликозилгидролаз, основанной на анализе гидрофобных кластеров и сходстве последовательностей. Ксиланазы с низкой молекулярной массой принадлежат к 11 семейству гликаназ (семейство G). Более крупные ксиланазы могут относиться к 10 семейству (семейство F), но экспериментально это еще не подтверждено (Biely, Tenkanen, 1998). *Trichoderma reesei* синтезирует две ксиланазы, закодированные генами *xyl1* и *xyl2*, которые деградируют β -1,4-D-ксилановую цепь гемицеллюлоз. Показаны различия в атомной структуре ксиланазы II *Trichoderma longibrachiatum* из 11 семейства (Baker, Dauter, 2004).

Две специфичные ксиланазы с низкой молекулярной массой из *T. reesei* Rut C-30: кислая XYN I (pI 5.5, 19 kDa) и щелочная XYN II (pI 9.0, 20 kDa) наиболее изучены из этого семейства, и некоторые их каталитические особенности соответствуют другим ксиланазам *Trichoderma*. Особенно это верно для XYN II, которая проявила более 90% гомологии к ксиланазам с низкой молекулярной массой из *T. harzianum* (ксиланаза A) и *T. viride*. Ксиланаза XYN I проявила только 50% гомологии к выше упомянутым ферментам. Несмотря на низкую гомологию, третичные структуры обоих ферментов схожи (рис. 2.7).

Особенности гемицеллюлаз *Trichoderma reesei* Rut C-30 (Biely, Tenkanen, 1998)

Фермент	Обозначение фермента	Ген	M _r ^a (kDa)	pH	pH-оптимум	Активность по отношению к сахаридам ^b		Примечание ^c
						олиго-	поли-	
Эндо- α -1,4-ксиланаза	XYNI	xyn1	19	5.5	4.0-4.5			НСА 11, 3-D структура определена
	XYNII	xyn2	20	9.0	5.0-5.5			НСА 11, 3-D структура определена
Эндо- β -1,4-маннаназа	MANI	Man1	51	3.6-5.4 ^d	3.5-5.0			НСА 5 содержит CBD
β -ксилозидаза	BXLI	β x11	100	4.7	4.0	+++	+	НСА 3
β -глюкозидаза	BGLI	β gl1	71	8.7	4.6	+++	-	НСА 3
	BGLII		114	4.8	4.0	+++	-	
α -арабино-фуранозидаза	ABFI	Abf1	53	7.5	4.0	+++	+++	НСА 54
α -галактозидаза	AGLI	agl1	50	5.2	4.0	+++	+	НСА 27
	AGLII	agl2	80	-	3.5-4.5	++	(+)	НСА 36
	AGLIII	agl3	66	-	3.5-4.5	+	(+)	НСА 27
α -глюкуронидаза	GLRI	glr1	91	5.0-6.2	4.5-6.0	+++	(+)	НСА новая
Ацетилэстераза	AE		45	6.0, 6.8 ^d	5.5	++	-	На ксило- и манноолигосахаридах
Ацетилксиланэстераза	AXEI	Axe1	34	6.8, 7.0 ^d	5.0-6.0	+++	+++	содержит CBD

^a Определено с помощью SDS-PAGE.

^b Указана активность вспомогательных ферментов по отношению к олигосахаридам и полисахаридам.

^c НСА и номер гликозилгидролазного семейства, CBD – целлюлозосвязывающий домен.

^d Содержит различные формы фермента.

Типы эндо- β -1,4-глюканаз, продуцируемые родом *Trichoderma*
(Biely, Tenkanen, 1998)

Ферментная группа	Молекулярная масса (kDa)	pH	Гидролиз целлюлозы	Семейство ферментов
1	18-23	В основном 8-9.5	нет	11
2	29-33	В основном 7-9.5	нет	неизвестно, вероятно, 10
3	53-57	4.5-5.3	да	7 (неспецифическая глюканаза)

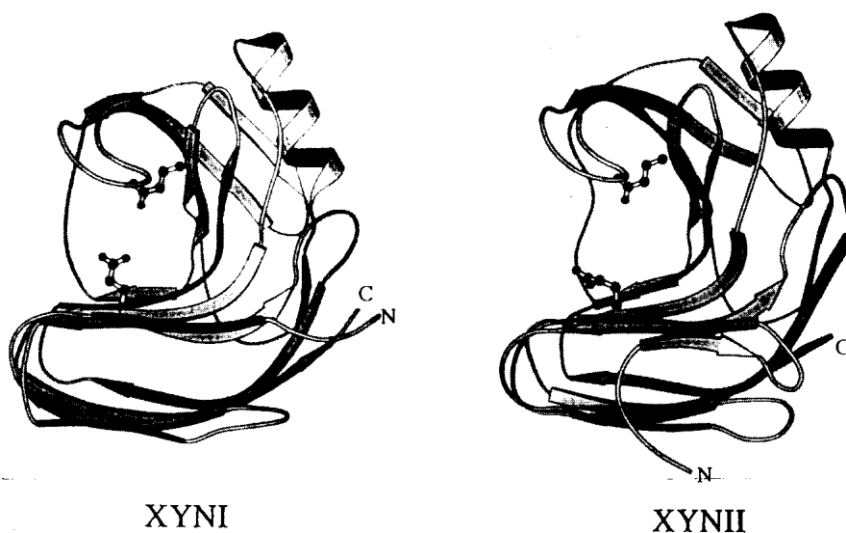


Рис. 2.7. Схема двух специфичных ксиланаз *Trichoderma reesei*. В углублении шариками и палочками обозначены карбоксильные группы каталитических остатков глутаминовой кислоты. Несмотря на большую схожесть в строении третичных структур, ферменты обладают разными каталитическими особенностями, указывая на различия в субстрат-связывающих сайтах (рис. адаптирован из Biely, Tenkanen, 1998).

Механизм действия обеих ксиланаз связан с сохранением конфигурации гликозидной связи при катализе гликозил-трансферазной реакции при высоких концентрациях субстрата. Ферменты XYN I и XYN II различаются частотой разрыва связи ксилоолигосахаридов (рис. 2.8), что объясняется разницей в положении их субстрат-связывающих сайтов (Biely, Tenkanen, 1998).

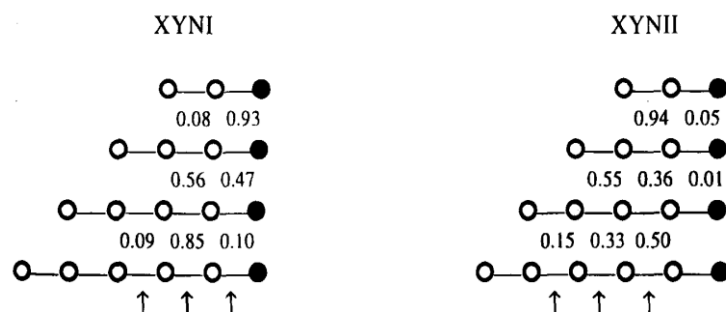


Рис. 2.8. Частота инициации разрыва связи $[1-^3\text{H}]$ -ксилоолигосахарид и сайтов расщепления ксилогексозы (стрелки) ферментами XYN I и XYN II *T. reesei*. Концентрация субстратов – 0.25 mM. Закрашенный кружок обозначает редуцирующийся конец ксилопиранозного остатка (рис. адаптирован из Biely, Tenkanen, 1998).

Активность ксиланаз

Гриб-продуцент ксиланаз значительно увеличивает синтез ферментов при наличии в среде специфических веществ-индукторов, как правило, являющихся продуктами неполного гидролиза субстрата. Благодаря наличию такого специфического биохимического механизма регулирования, генетический аппарат клетки настраивается на синтез такого ферментного комплекса, который, поступая во внешнюю среду, способствует максимальному гидролизу субстрата. Так, при использовании «химических» индукторов, таких, как очищенные микроцеллюлоза и глюкан, было отмечено увеличение выхода фермента и снижение его себестоимости (Околелова, 2001).

В работе Мэч (Mach, 1998) отмечено, что *Trichoderma* для синтеза ферментов нуждается в присутствии Ca^{2+} . В работе Кобоса изучены свойства ксиланазы, полученной при культивировании *Trichoderma reesei* QM 9414. В пределах от 0 до 1M NaCl показано отсутствие зависимости активности ксиланазы от ионной силы раствора (Cobos, 2003).

С использованием уравнения Михаэлиса-Ментена ($V = V_s / (K_m + S)$) определены кинетические параметры процессов ферментативного гидролиза букового ксилана (1-14 мг/мл) и ксилана овса (1-20 мг/мл) ксиланазами *Trichoderma reesei*. Для ксилана овса $K_m = 12.11 \pm 3.1$ мг/мл и $V = 1709 \pm 211$ мМ/мин*мл и для ксилана бука $K_m = 2.79 \pm 0.5$ мг/мл и $V = 1621 \pm 96$ мМ/мин*мл (Cobos, 2003). Ксиланазы *Trichoderma reesei* была стабильна при предварительной инкубации при 50°C, тогда как при 55°C теряла половину активности в течение 30 минут. Оптимум активности ксиланазы наблюдался при 55°C, энергия активации ферментативной реакции, посчитанная согласно уравнению Аррениуса в диапазоне температур 20-55°C была 32 кДж/моль, что позволяет говорить об отсутствии высокого энергетического барьера при гидролизе. Это является причиной экспоненциального повышения количества энергетически готовых к реакции молекул фермента и соответственно скорости ферментативного гидролиза при небольшом увеличении температуры. Оптимум pH ксиланазы был отмечен при 5.0, и фермент сохранял стабильность при преинкубации в течение 30 минут при 20-25°C, pH 3.5-8.5. При pH 5.0-8.5 ксиланазы сохраняла 80% активности в течение 22 часов. При снижении pH в кислую сторону активность при комнатной температуре резко снижалась.

Термоинактивации ксиланазы изучалась при температурах 55-70°C. Отмечена линейная зависимость натурального логарифма активности ксиланазы от возрастающей величины температуры, с коэффициентом корреляции 0.98. (рис. 2.9). Причем инактивация необратима. В работе Джанис (Jänis, 2001) отмечалось, что около 10-15% XYN2 подвергается димеризации при инкубации в буферном растворе при 50°C. Вычислены константы термоинактивации (k_d) при температурах 55°, 60°, 65° и 70°C.

Параметр D показывает время (в мин), которое фермент должен инкубироваться при данной температуре с потерей 10% активности. Так как ксиланазы используют в качестве добавок к животным кормам и к тесту в хлебопечении, график, показывающий изменение $\log D$ в зависимости от температуры, имеет практическое значение.

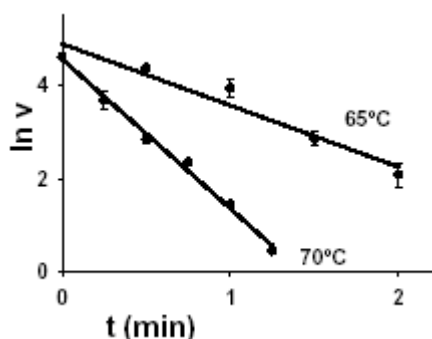


Рис. 2.9. Температурная зависимость активности ксиланазы, где V – активность ксиланазы.

В результате изучения процесса культивирования *Trichoderma reesei* в диапазоне pH 4.8-7.0 и анализа активности экзогенных ксиланаз установлено, что максимум активности ферментов достигается при pH 4.8, величина оптимума в данном случае практически совпадает с физиологическим оптимумом pH=5,0 в верхних отделах тонкого кишечника, а оптимальное pH синтеза ксиланаз – 6.4-6.7 (Colina, 2003).

Изучена активность эндо-ксиланазы (1,4-d-xylanohydrolase, EC 3.2.1.8), полученной при культивировании *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 на ксиланах овса. Изучение продукции ксиланаз этим штаммом имеет большое значение для получения кормов для животноводства и в экологии. Определены оптимальные условия действия фермента – pH 5.0-6.0, при температуре 45°C (Chinshuh, 1997). Температурный оптимум очень важен для полного проявления активности фермента при применении его в качестве компонента кормов (и даже в большей степени, чем pH-оптимум), поскольку температура тела живого организма – более постоянная величина, чем pH в разных отделах кишечника, а максимальная температура тела вообще не может превышать физиологически допустимого предела.

Нами исследовано более 200 штаммов, среди которых изолят *Trichoderma* 302, выделенный на территории РТ, показал наибольшую активность синтеза ксиланаз (8.82 ± 0.21 IU/ml). Еще два штамма Т.303 и Т.328 показали продуктивность синтеза ксиланаз выше промышленного продуцента *Trichoderma reesei*, ксиланазная активность препаратов которого была 2.22 ± 0.23 IU/ml (Скворцов и др., 2005).

Исходя из исследованных свойств полученных грибных ксиланаз, нами принято решение исследовать влияние добавок препаратов *T. reesei*, проявивших большую устойчивость при pH=2, на переваримость рационов моногастрических животных. В этих исследованиях установлено повышение переваримости в модельных экспериментах *in vitro* зерновых кормовых компонентов рационов, содержащих 50 % ржи – на 4.5-5.2% по сравнению с контролем без ксиланаз. В исследованиях определены оптимальные нормы ввода ксиланаз. Выявлено, что для кормовых рационов из зерновых смесей, содержащих 50% ржи оптимальная дозировка ксиланаз – 0.20-0.25 IU/г (Скворцов и др., 2005).

Типичные кривые продукции ксиланазы и двух сопутствующих ферментов ксиланазного комплекса приведены на рисунке 2.10. Ферменты быстро накапливаются в культуральной среде в течение первых 3 дней. Активности ацетилэстеразы и β -ксилозидазы появляются первыми и достигают пика в 59 и 13 U/ml, соответственно. Максимальная активность эндоксиланазы была 20 U/ml после 5 дней инкубации,

однако после достижения пиковых значений активности ферментов с течением времени уменьшались.

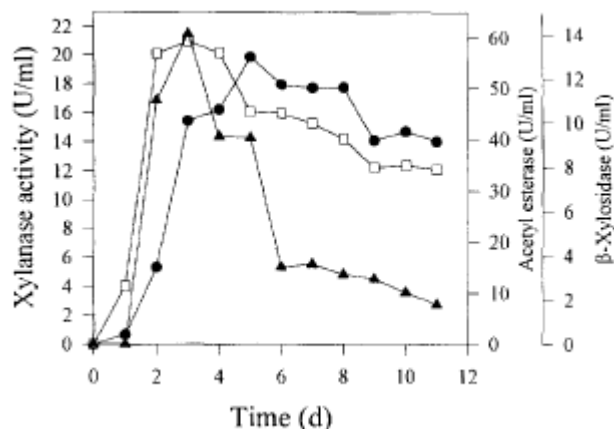


Рис. 2.10. Активность ферментов при культивировании *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 на оптимальных средах.

(●) – ксиланаза, (▲) – β -ксилозидаза, (□) – ацетил эстераза.

Проведена характеристика неочищенной ксиланазы, синтезируемой высокопродуктивным по ксиланазе штаммом *Trichoderma sp.* 183 (Fu-hong, 2003). Показано, что при культивировании *Trichoderma sp.* 183 на среде с пшеничными отрубями и ксиланом в качестве основного источника углерода при 28⁰С и скорости перемешивания 190 об./мин показатели рН и ферментативной активности возрастали с ростом штамма. Ферментативная активность достигла максимума 298.47 ед./мл через 84 часа после внесения посевного материала. Оптимальными условиями для фермента были рН 6 и температура 50⁰С. Фермент был относительно стабилен при 40⁰С и в интервале рН 5-7. Отмечено, что ионы Fe²⁺ и Hg²⁺ сильно ингибировали активность фермента, тогда как Zn²⁺, Ca²⁺ и Cu²⁺ способствовали проявлению активности.

Исследовалось влияние различных источников углерода на активность эндо-1,4- β -глюканазы и ксиланазы. Было показано, что искусственные среды на основе лактозы, целлюлозы и L-сорбозы по эффективности сопоставимы с натуральными – на основе ксиланов овса и пшеничных отрубей (Naarala, 1996).

Для биосинтеза ксиланаз, помимо выше отмеченных источников углерода, который может являться индуктором синтеза гидролаз полисахаридов, необходим источник азота. Причем в случае использования белка в качестве источника азота он может являться и источником углерода. Наличие белка в среде может вызвать синтез продуцентом протеаз, что крайне нежелательно при целевом биосинтезе гидролаз полисахаридов. Поэтому вопрос оптимизации источника азота не менее важен (Biely, Tenkanen, 1998).

Изучалось влияние различных источников азота на продукцию экзоферментов *T. reesei*. Показано, что среда, содержащая комплексные источники азота: протеолизат пептона и экстракт дрожжей, является предпочтительной как для биосинтеза эндоглюканазы, так и ксиланазы. Протеолизат пептона содержит незаменимые аминокислоты, а экстракт дрожжей является хорошим источником комплекса витаминов В (Biely, Tenkanen, 1998).

Изучалась индукция синтеза ксиланаз *Trichoderma reesei* Rut C-30 при росте на растительных гидролизатах, богатых L-арабинозой. Получено значительное увеличение ксиланазной активности при росте на гидролизатах овсяной шелухи и сахарной свеклы по сравнению с лактозой. Для культур, выросших на гидролизате овсяной шелухи и лактозе, ксиланазная активность была в 9 раз выше по сравнению (~510IU/ml) с ростом

на лактозе. Такая же высокая активность (~630IU/ml) была получена при культивировании на гидролизате сахарной свеклы и лактозе. Продукция целлюлазы явно уменьшалась при культивировании *T. reesei* на обоих гидролизатах по сравнению с ростом на лактозе. Кроме того, относительное содержание ксиланаз I–III при культивировании на разных источниках углерода не различалось (Xiong et al., 2005).

β-ксилозидазы

Комплекс включает в себя ферменты α-глюкуронидазу, α-арабинофуранозидазу и ацетилксиланэстеразу. Информации об этом ферментном комплексе меньше, чем о ксиланаз. Основной причиной может быть то, что штаммы *Trichoderma* не являются эффективными продуцентами этого фермента, и долгое время не было ясно какой тип β-ксилозидаз продуцируется: это ксилобиазы или экзо-β-ксиланазы, какой субстрат предпочтителен: димеры или длинная цепь олигосахаридов/полимеров. Для β-ксилозидаз из *T. viride* и *T. reesei* показаны гидролиз ксилоолигосахаридов, 4-нитрофенил-β-D-ксилопиранозида и низкая активность к 4-нитрофенил α-L-арабинофуранозиду. Их арил-β-ксилозидазная активность конкурентно ингибируется D-ксилозой (Biely, Tenkanen, 1998).

Выделение гена, кодирующего β-ксилозидазу (*bxl1*), позволило сравнить фермент с другими гидролазами. Полученная аминокислотная последовательность β-ксилозидазы *T. reesei* не показала сходства с другими β-ксилозидазами (семейства 39, 43 и 52 гликозил-гидролаз), но была выявлена значительная гомология с консервативными группами β-ксилозидаз, относящихся к гликозил-гидролазам 3 семейства (цит. по Biely, Tenkanen, 1998).

α-Глюкуронидаза, α-арабинофуранозидаза и ацетилксиланэстераза высвобождают боковые группы различных ксиланов (рис. 2.6) или замещенных олигосахаридов. Перемещение боковых группировок делает ксилопиранозные остатки основной ксилановой цепи или ксилоолигосахаридов более доступными для деградации ксиланазой или β-ксилозидазой. *T. reesei* является хорошим источником различных ферментов, отщепляющих боковые группы.

α-Глюкуронидаза. *T. reesei* продуцирует одну основную α-глюкуронидазу GLRI. Это довольно большой белок с молекулярной массой 91 kDa. Его ген (*glr1*) был первым микробным α-глюкуронидазным геном, который был клонирован и охарактеризован. Полученная аминокислотная последовательность фермента не показала значительного сходства с другими последовательностями белков. Вероятно α-глюкуронидаза представляет новую группу гликозил-гидролаз.

Фермент обладает строгой субстратной специфичностью. Он действует на ксилоолигосахариды. α-Глюкуронидаза эффективно работает только вместе с ксиланазой и β-ксилозидазой (Biely, Tenkanen, 1998).

α-Арабинофуранозидаза. Основной α-арабинофуранозидазой *T. reesei* является ABFI, которая кодируется геном *abf1*. Полученная аминокислотная последовательность фермента не показала значительного сходства с другими охарактеризованными бактериальными α-арабинофуранозидазами, но имела большое сходство с одной из α-арабинофуранозидаз *Aspergillus niger* (ABF B) и ферментом, кодируемым геном *xyl1* из *T. koningii*. В настоящее время эти ферменты отнесены к 54 семейству гликозил-гидролаз. α-Арабинофуранозидаза способна переносить α-1,3-связанную арабинофуранозную боковую группу из однозамещенного ксилопиранозида ксилоолигосахаридов или полимерного ксилана (Biely, Tenkanen, 1998).

Ацетилксиланэстераза. Впервые ацетилксиланэстераза (AXE) была показана для *T. reesei* и *T. viride*. Штаммы *T. reesei* QM 9414 и Rut C-30 продуцируют большее количество фермента при росте на среде с ксиланом, целлюлозой или смесью этих полисахаридов. Эстераза, действующая на ксилоолигосахарид, названа ацетилэстераза

(АЕ), другая эстераза, которая действует также на полимерный ксилан, названа ацетилксиланэстераза. Полученная аминокислотная последовательность АХЕ не показала сходства с известными аминокислотными последовательностями ацетилксиланэстераз. Интересно, что фермент проявил некоторое сходство с грибными кутиназами – сериновыми эстеразами, гидролизующими кутин. АХЕ катализирует деацетилирование в положениях 2 и 3 быстрее, когда другое положение не ацетилировано. АЕ обладает активностью против коротких олигомерных и мономерных ацетатов и по отношению к ксилобиозе, ацетилированной по ксилопиранозному остатку нередуцирующегося конца (Biely, Tenkanen, 1998).

β-маннанызы

Основной гемицеллюлозой древесины мягких пород является галактоглокоманнан, присутствующий в двух формах, различающихся по содержанию галактозы. Для формы с низким содержанием галактозы соотношение галактоза:глюкоза:манноза составляет 0.1:1:4, а для формы с высоким содержанием галактозы – 1:1:3. Основная цепь обоих типов галактоглокоманнанов строится из β-1,4-связанных D-маннопиранозного и D-глюкопиранозного остатков, расположенных произвольно. α-D-галактопиранозные остатки связаны с D-маннопиранозилами α-1,6-связями. Примерно каждый четвертый гексапиранозный остаток в основной цепи частично ацетилирован во 2 или 3 положениях. Глюкоманнаны и галактоманнаны с некоторыми структурными вариациями также встречаются в некоторых однолетних растениях, особенно в зерновых, клубеньковых и луковичных (цит. по Biely, Tenkanen, 1998). Основные структурные особенности растительных галактоглокоманнанов и ферментов их полного гидролиза показаны на рисунке 2.11.

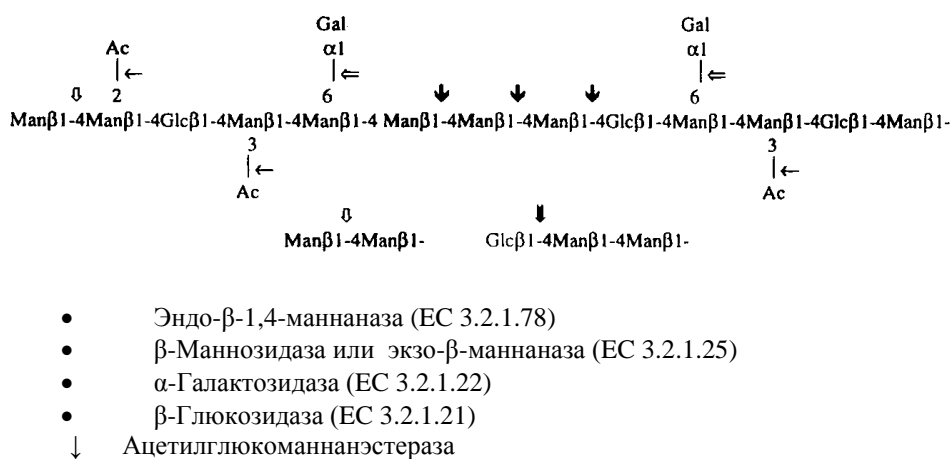


Рис. 2.11. Гипотетический растительный галактоглокоманнан и ферменты его полного гидролиза. β-1,4-глюкопиранозная связь основной цепи гидролизуеться эндо-β-1,4-глюканазой (рисунок адаптирован из Biely, Tenkanen, 1998).

Эндо-β-маннанызы – ферменты, гидролизующие β-1,4-гликозидную связь в маннанах, галактоманнанах, глюкоманнанах и галактоглокоманнанах. Маннанызы изучены меньше ксиланаз. Штаммы *T. harzianum* E58 и *T. reesei* Rut C-30 продуцируют разные формы маннаназ. Фермент продуцируется при использовании в качестве источника углерода целлюлозы или различных маннанов. Исследованные маннанызы *T. reesei* Rut C-30 имели молекулярную массу 51 kDa и 53 kDa, изоэлектрические точки 4.6 и 5.4, соответственно. Фермент кодируется геном *man1*, и его делеция из генома *T. reesei* приводит к снижению маннаназной активности ниже 10% (цит. по Biely, Tenkanen, 1998).

Маннаназы имеют мультидоменную структуру подобно некоторым целлюлазам: каталитический домен и CBD разделены линкерным пептидом. Фермент относится к 5 семейству гликозил-гидролаз.

β-Маннозидаза. *β*-Маннозидазы *Trichoderma* плохо изучены. Возможно, они локализованы интрацеллюлярно. В этом случае маннанные фрагменты могут транспортироваться в клетку с помощью связанной с плазмалеммой транспортной системы, сопровождая биосинтез целлюлаз.

β-Глюкозидаза. Известно, что *T. reesei* продуцирует по крайней мере две *β*-глюкозидазы. Активность этих ферментов по отношению к глюкоманноолигосахаридам не изучена, но *β*-глюкозидазы других организмов способны переносить глюкопиранозные остатки нередуцирующегося конца этих олигосахаридов (Biely, Tenkanen, 1998).

α-Галактозидаза. *T. reesei* продуцирует по крайней мере три различные *α*-галактозидазы AGLI, AGLII и AGLIII, кодируемые генами: *agl1*, *agl2* и *agl3*.

AGLI является самой активной *α*-галактозидазой по отношению к полимерным галактоманнанам. Изученные AGLI имели молекулярную массу 50 ± 3 и 54 kDa и изоэлектрические точки 5.2 и 5.25. AGLII почти не активна к полимерному субстрату, степень гидролиза повышалась при добавлении *β*-маннозидазы. Действие AGLIII также усиливалось при добавлении маннаназы и *β*-маннозидазы. Однако степень гидролиза была ниже, чем у AGLII (Biely, Tenkanen, 1998).

Ацетилглюкоманнанэстераза. Ацетилэстераза (АЕ) *T. reesei*, активная в отношении ксилоолигосахаридов, может воздействовать и на ацетилированные манноолигосахариды (Biely, Tenkanen, 1998).

2.1.2.1. Регуляция экспрессии гемицеллюлаз

Trichoderma reesei синтезирует две специфические формы ксиланаз и одну неспецифическую (эндоглюканазу) при культивировании на целлюлозе или ксилане. При индукции софорозой образуется только одна из двух ксиланаз, в отличие от индукции ксилобиозой, вызывающей синтез двух ксиланаз, но не образуется эндоглюканаза I (Kubicek, Penttilä, 1998).

При исследовании регуляции экспрессии ксиланаз на уровне транскрипции выявлено различное действие ксиланаз по отношению к глюкозе. Транскрипция *xyn1* индуцируется в присутствии ксилана и ксилозы и не проявляется в присутствии глюкозы. И наоборот, промотер *xyn2* способен инициировать небольшой базовый уровень транскрипции даже на глюкозе, который увеличивался в присутствии ксилана и ксилобиозы. Транскрипция *xyn2* также индуцировалась софорозой и целлюлозой, в отличие от *xyn1* (Kubicek, Penttilä, 1998).

Интересно, что добавка глюкозы к культурам, растущим на ксилане, уменьшает экспрессию *xyn2* до базового уровня, тогда как транскрипция *xyn1* не меняется. В отличие от целлюлазной системы, проявляется некоторый конститутивный уровень ксиланазной активности *Trichoderma reesei* (цит. по Kubicek, Penttilä, 1998).

Также изучалась индукция синтеза ксиланаз *Trichoderma reesei* Rut C-30 при росте на растительных гидролизатах, богатых L-арабинозой. Для культур, выросших на гидролизате овсяной шелухи и лактозе, ксиланазная активность была в 9 раз выше по сравнению (~510IU/ml) с ростом на лактозе. Такая же высокая активность (~630IU/ml) была получена при культивировании на гидролизате сахарной свеклы и лактозе. Кроме того, относительное содержание ксиланаз I–III при культивировании на разных источниках углерода не различалось (Xiong et al., 2005).

Обработка конидий и мицелия *Trichoderma reesei* 0,1 М HCl или Tween 80 не влияла на способность грибов образовывать ксиланазы на среде с ксиланом, хотя обработка удаляла и инактивировала поверхностно связанные ксиланазы. Это, видимо,

связано с ролью конститутивной секреции некоторого уровня активности *xyn2* (Kubicek, Penttilä, 1998).

Согласно другим результатам, софороза индуцирует экспрессию *xyn1* и *xyn2*, как и ксилобиоза при добавлении к глицериновой среде. Описанный уровень экспрессии *xyn1* ниже, чем *xyn2*, может показаться, что приведенные ниже результаты противоречат друг другу. Не отмечено экспрессии *xyn1* или *xyn2* при росте грибов на глюкозе, но исчезновение глюкозы вызывает значительную экспрессию *xyn2*. Возможно, что *xyn1* является исключением среди многих генов гемицеллюлаз – у него не снимается репрессия после удаления глюкозы. С другой стороны, *xyn2* не репрессируется глюкозой в *cre1-1* мутантном штамме Rut-30. Не обнаружено экспрессии *xyn1* и *xyn2* при росте *Trichoderma reesei* на среде, богатой ксилозой (Kubicek, Penttilä, 1998).

Однако отмечено, что в отличие от генов целлюлаз, *xyn1* и *xyn2* экспрессируются несоординированно, это подтверждено многочисленными исследованиями. Также это оказывается справедливым при применении ксиланов из разных природных источников в качестве источников углерода, ген *bxll*, кодирующий β -ксилозидазу¹, экспрессируется при тех же условиях, что *xyn1* и *xyn2* (Kubicek, Penttilä, 1998).

В настоящее время выделен ген α -D-галактозидазы, которая отщепляет галактозу от боковых цепей гемицеллюлаз или олигосахаридов, и α -L-арабинофуранозидаза, которая также отщепляет арабинозу. Другие гены включают ген, кодирующий β -D-ксилозидазу, которая, главным образом, гидролизует ксилоолигосахариды и ксилобиозу и гены, кодирующие ацетилксиланэкстеразу и α -D-глюкуронидазу, которые отщепляют уксусную и глюкуроновую кислоту от гемицеллюлозы соответственно (Kubicek, Penttilä, 1998).

Показана сильная дифференцировка экспрессии генов *Trichoderma reesei* QM 9414 при разных условиях. Таким образом, показано действие различных механизмов регулирования, вовлеченных в экспрессию генов. Гены *agl1* и *agl2* индуцируются галактозой, но не лактозой. *axe1* и ксиланазы, включая *bxll*, индуцируются различными ксиланами, *abfl1* особенно сильно экспрессируется на ксилане овса, замещенном арабинозой. Интересны данные о появлении экспрессии *agl3* только в *cre1-1* мутанте штамма Rut C-30. Два другие *agl* гена и *bxll* экспрессируются в различных условиях. Экспрессия β -ксилозидазы, кодируемой геном *bxll*, значительно выше, чем экспрессия β -глюкозидазы, кодируемой геном *bgl1*. Взаимодействие ферментов этих генов, экспрессируемых при многих условиях, и их индукция в присутствии полимерных субстратов является весьма интересным направлением исследований. Экспрессия L-галактозидазы, наоборот, индуцируется только галактозой. Ксилобиоза и софороза, с другой стороны, представляются как общие индукторы, увеличивающие экспрессию различных генов. Как и целлюлазные гены, большинство генов гемицеллюлаз экспрессируется при наличии индукторов. Исследования, проведенные с *cre1-1* мутантом RutC-30 и RutC-30, дополненным диким типом гена *cre1*, показали, что *bxll*, *agl1*, *agl2*, *agl3* и *axe1* репрессируются *cre1* медиатором катаболической репрессии (Kubicek, Penttilä, 1998).

Анализ промоторов ксиланаз

При культивировании на глюкозе у промотора *xyn2* был обнаружен комплекс ДНК-белок. Этот комплекс исчезал при индукции ксиланом или софорозой.

Нозерн-анализ экспрессии *xyn1* показал, что в *cre1-1* мутанте *Trichoderma reesei* Rut C-30, растущем на глюкозе, также проявляется базовый уровень транскрипции *xyn1*. В *Trichoderma reesei* Rut-30, также в штаммах, содержащих мутацию *xyn1_p:hph*, проявляется высокий уровень транскрипции *xyn1* при индукции ксилозой или ксиланом в культуральных средах на глюкозной основе. В аналогичных исследованиях с

промотором *xun2* описано образование крупного ДНК-белок комплекса при индукции ксиланом. При культивировании грибов на среде, содержащей ксилан и глюкозу, образовался значительно меньший комплекс, что говорит о препятствовании глюкозы активации гена. Авторы пока не имеют свидетельств того, что в этот процесс вовлечен CRE1. Репрессия может происходить и как конкурентное связывание участков промотора, и как ингибирование взаимодействия РНК-полимеразы II с иницирующим комплексом (Kubicek, Penttilä, 1998).

При исследовании свойств генов, кодирующих различные целлюлазы и гемицеллюлазы *Trichoderma reesei*, достигнута стадия, на которой исследования деградации растительных полисахаридов могут проводиться на молекулярном уровне. Исследования, проведенные с *Trichoderma reesei*, имеют важнейшее значение для понимания механизмов регуляции гемицеллюлазных ферментов грибов. Уже ясно, что в регуляцию синтеза ферментов вовлечены различные механизмы. Современные достижения позволяют определить специфические активаторы транскрипции целлюлазных и гемицеллюлазных генов. Эти данные будут являться основой для дальнейших работ в направлении раскрытия внутриклеточных путей медиаторов, передающих сигнал от внеклеточных растительных полисахаридов к транскрипционному механизму генов целлюлаз и гемицеллюлаз. В заключение надо отметить, что грибы располагают большим набором ферментов, необходимых для деградации целлюлозы и гемицеллюлозы (Kubicek, Penttilä, 1998).

2.1.3. Характеристика глюканаз рода *Trichoderma*

Глюканы – это гомополимеры D-глюкозы. Некоторые из них представляют собой простые цепи остатков глюкозы, другие имеют более сложную разветвленную структуру. Однако многие прочие глюканы и глюкан-разлагающие ферменты синтезируются различными организмами (табл. 2.5) (Benitez et al., 1998).

Оба типа, α - и β -глюканы, широко распространены в природе. Среди других гликогенов – α -1,4-глюкан, служащий клеточным запасным веществом. Полисахарид широко распространен в грибах, за исключением оомицетов, которые содержат β -1,3-глюканы в качестве основных углеводов (цит. по Benitez et al., 1998).

Глюканы также входят в состав клеточной стенки и являются секретируемыми полисахаридами. Глюканолитические энзимы широко распространены среди высших растений, бактерий и имеют различные физиологические функции, зависящие от источника. В растениях они предназначены для действия в качестве части защитной системы против грибных патогенов. У бактерий этому ферменту приписывают функцию поставки питательных веществ в клетку.

Т а б л и ц а 2.5

Гены глюканаз *Trichoderma* (Lorito, 1998)

Ген/ фермент	Число сиквенсов в базах данных
bgn1 (эндо- β -1,3-глюканаза)	1
bgn2 (эндо- β -1,3-глюканаза)	1
bgn3 (эндо- β -1,3-глюканаза)	2
gluc78 (эндо- β -1,3-глюканаза)	2
b16-1 (эндо- β -1,6-глюканаза)	2
b16-2 (эндо- β -1,6-глюканаза)	2
b16-3 (эндо- β -1,6-глюканаза)	2

Обсуждаются различные функции грибных β -глюканаз: мобилизация глюканов в клеточной стенке и накопление углеводов, деградация каллозы в растениях (табл. 2.6).

Фракционирование препаратов *T. viride* хроматографией позволяет получить препараты β -глюканаз, свободные от амилоглюкозидазы, и амилоглюкозидазу, свободную от глюканаз, которые могут быть полезны в анализе β -глюканов в ячмене. β -глюканы включают две эндоглюканызы и одну экзо- β -1,3-глюканазу с изоэлектрической точкой (pH) 5.25. Выделена эндоглюканаза III *T. reesei* (Wang et al., 2005).

Из других коммерческих энзимных препаратов *T. viride*, под названием «Опозука» очищены две β -1,3-глюканызы: кислая нелитическая β -1,3-глюканаза, гидролизующая ламинарин, и проявляющая литическую активность на клеточных стенках *Saccharomyces*. Частично очищена экзо- β -1,3-глюканаза, синтезируемая другим штаммом *T. viride* в ходе роста на клеточной стенке.

β -глюканаза ферментной системы микопаразита *T. harzianum* СЕСТ 2413 исследована детально. Показано содержание в комплексе одного основного и, по меньшей мере, трех кислых энзимов, которые могут быть разделены изоэлектрическим фокусированием. Основной энзим BGN13.1 был очищен до гомогенности. Его молекулярная масса составляет 78 кДа, и он не гликозилирован. Энзим проявлял максимальную активность на клеточной стенке *S. cerevisiae* и ламинарине. Энзим специфичен для 1,3-связи и проявляет экзо-тип активности, показано, что его свойства уникальны для *Trichoderma* (цит. по Benitez et al., 1998).

T. harzianum СЕСТ 2413 также синтезирует по меньшей мере две экзогенные эндо-глюканызы с молекулярной массой 51 и 43 кДа, которые также были очищены до гомогенности. Глюканаза BGN16.2 (43 кДа) была активной к β -1,6-связям, проявляя эндо-тип активности (Benitez et al., 1998).

Анализы фильтратов различных штаммов *Trichoderma* (*T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. koningii* и *T. virens*) показали, что они все образуют BGN16.2 при сходных условиях.

Таблица 2.6

Роль грибных глюканаз (Benitez et al., 1998)

Тип	Источник	Роль	Пример
β-1,3-глюканаза	Oomycetes	Субстратная Морфогенез	Мобилизация β-1,3-глюканового углевода Дегградация β -1,3-глюкановых компонентов клеточной стенки
	Ascomycetes	Морфогенез	Синтез клеточной стенки <i>Neurospora crassa</i> Споруляция <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		Субстратная	Мобилизация β-1,3-глюкана <i>Penicillium</i>
	Basidiomycetes	Питательная	Мобилизация запасяющего углевода <i>Schizophyllum commune</i>
		Морфогенез	Дифференциация плодовых тел <i>Agaricus bisporus</i>
	Deuteromycetes	Противогрибная	Синтез клеточной стенки <i>S. commune</i> Лизис хозяйской клеточной стенки в микопаразитах: <i>Trichoderma</i> , <i>Stachybotrys</i>
		Морфогенез	Дегградация β-1,3-глюкана клеточной стенки <i>Trichoderma Candida</i>
α-1,3-глюканаза	Ascomycetes	Питательная	Мобилизация запасяющего α-1,3-глюканового углевода <i>Aspergillus nidulans</i>
		Морфогенез	Дегградация α-1,3-глюканов клеточной стенки склероций <i>A. nidulans</i>
	Basidiomycetes	Питательная	
		Морфогенез	Дегградация клеточных стенок <i>S. commune</i>
	Deuteromycetes	Противогрибная	
α-1,4-глюканаза (α-амилаза)	Oomycetes	Субстратная	Мобилизация запасяющего крахмального углевода <i>Mucor</i>
	Ascomycetes	Субстратная	Мобилизация запасяющего крахмального углевода
		Морфогенез	Специфика споруляции <i>Saccharomicopsis fibulligera</i>
	Basidiomycetes	Субстратная	Мобилизация запасяющего крахмального углевода
глюкоамилаза (exo α-1,4; α-1,3; α-1,6)	Zygomycetes	Субстратная	Мобилизация запасяющего углевода <i>Rhizopus</i>
	Ascomycetes	Субстратная	Мобилизация запасяющего углевода <i>Aspergillus</i> spp. и <i>S. cerevisiae</i>
		Морфогенез	Синтез клеточной стенки <i>Aspergillus</i>

Продолжение табл. 2.6

	Deuteromycetes	Субстратная	Мобилизация запасяющего углевода <i>T. reesei</i>
β -1,2-глюканаза	Ascomycetes	Субстратная	Деградация β -1,2-глюкана <i>Aspergillus</i> spp.
	Deuteromycetes	Субстратная	Деградация β -1,2-глюкана <i>Fusarium</i> spp.
β -1,4-глюканаза	Oomycetes	Морфогенез	Синтез клеточной стенки <i>Achlya</i>
	Ascomycetes	Субстратная	Деградация целлюлозы при росте на древесине <i>Aspergillus</i>
	Basidiomycetes	Субстратная	Деградация целлюлозы при росте на древесине <i>A. bisporus</i>
	Deuteromycetes	Субстратная	Деградация целлюлозы <i>T. reesei</i>
β -1,6-глюканаза	Ascomycetes	Морфогенез	Синтез клеточной стенки β -1,6-глюкана клеточной стенки <i>S. cerevisiae</i>
	Basidiomycetes	Морфогенез	Синтез клеточной стенки <i>S. commune</i>
	Deuteromycetes	Противогрибная	Лизис хозяйской клеточной стенки в микопаразитах

Некоторые другие глюканызы с разными каталитическими активностями, молекулярными массами и субстратными специфичностями обнаружены в супернатантах культур *T. harzianum*. Возможно, они являются разными продуктами одного гена или разных генов. Обнаружены β -1,3-глюканызы, синтезированные другим штаммом *T. harzianum*, при росте в присутствии хитина или изолированных грибных клеточных стенок. Кислая эндо- β -1,3-глюканыза (36 кДа) была очищена и оказалась активна к ламинарину. Также описаны другие две экзо- β -1,3-глюканызы (32 и 78 кДа) из *T. harzianum* и одна экзо- β -1,3-глюканыза (70 кДа) из штамма *T. reesei*. Эти β -1,3-глюканызы из *T. harzianum* и *T. reesei* проявляются как экзо-энзимы, гидролизующие β -1,3-связи и менее эффективны к 1,6-связям (Benitez et al., 1998). При росте на ботриосферане (экзополисахарид β -1,3; 1,6-D-глюканового типа *Botryosphaeria rhodina* в качестве источника углерода *T. harzianum* продуцировала β -1,3-глюканызу (Giese et al., 2005).

По данным Рей с соавторами (Rey et al., 2001) изоляты *T. harzianum*, гидролизующие пестулан (полимер β -1,6-глюкана) и выделяющие желтый пигмент (β -пирон), паразитировали на спорулирующей *Rhizoctonia solani* и защищали эффективнее других биоконтрольных штаммов виноград от *Botrytis cinerea*. В работе Бенитез (Benitez, 2004) говорится о том, что клонировано только некоторое количество генов *Trichoderma*, такие, как *bgn 13.1* и *lam 1.3* из *T. harzianum*, *glu 78* из *T. atriviride*, *Tv-bgn 1* *Tv-bgn 2* *bgn 13.1* из *T. virens*. На сегодня конструирован только штамм *T. harzianum* с высокой экспрессией гена *bgn 13.1*. Установлено, что трансформанты с высокой экспрессией *bgn 13.1* ингибируют рост *B. cinerea*, *R. solani* и *Phytophthora citrophthora*. Трансформант T28 с самым высоким уровнем активности глюканызы *bgn 13.1* как в условиях репрессии, так и в условиях индукции, ингибировал патогены в большей степени. В большей степени антагонизм проявился против *P. citrophthora*-оомицетов, основным компонентом клеточной стенки которых является целлюлоза и глюкан, чем против *Botrytis* и *Rhizoctonia*, в клеточных стенках которых главными компонентами являются хитин и глюкан. Кроме того, β -1,6-глюканызы были получены из штамма 2413. BGN16.2 обладала высокой антигрибной активностью и снижала рост *B. cinerea* и *Gibberella fujikuroi* сама по себе или в комбинации с хитиназами. Трансформанты, продуцирующие BGN16.2, контролируют рост *B. cinerea* и *R. solani*.

2.1.4. Характеристика протеаз *Trichoderma*

Протеазы играют разнообразные и часто центральные роли в клеточном метаболизме, питании и морфогенезе. Белки и пептиды используются *Trichoderma* в качестве источника углерода, азота и серы и гидролизуются до пептидов и аминокислот, соответственно. Также они могут отвечать за постсекреционный процессинг множества форм внеклеточных гидролитических ферментов *Trichoderma* (Benitez et al., 1998).

Активность протеаз регулируется катаболитной репрессией источниками углерода, азота и серы. По своим функциям протеазы делятся на аминопептидазы, карбоксипептидазы и эндогидролазы. В свою очередь, эти группы делятся на серин-, тиол-, карбоксил- или металло-протеазы. Протеазы синтезируются в присутствии гиф и клеточных стенок грибов. Аспартат- и серин-зависимые протеазы и их гены выделены, изучены. MW аспартат-зависимой протеазы составляет 42.4 кДа, pH 3-5, фермент чувствителен к пепстатину А. Описана сериновая протеаза *T. harzianum*, она индуцируется β -глюканами и клеточными стенками грибов. Сериновый комплекс представлен тремя различными протеазами: pI 6.5, 7.0, 9.2. Щелочная (сериновая) протеаза *T. harzianum* имеет MW 31 кДа и гидролизует субстраты, специфичные к химотрипсину и аминопептидазе. Аминокислотные последовательности сериновых

протеаз гомологичны протеазе К. Ген сериновой протеазы *prb1* выделен с помощью кДНК, содержит два интрона, присутствует в виде одной копии в геноме *T. harzianum* и высоко гомологичен аналогичному гену *T. viride prb1* регулируется катаболитной репрессией и активируется в процессе микопаразитизма. Аминокислотная последовательность показала высокую гомологию с некоторыми субтилизин-подобными протеазами (Benitez et al., 1998).

Сериновые протеиназы *T. koningii*, выделенные Гайда с соавторами (Гайда и др., 1981а), обладали рI 6,7 и рН 10,5 и инактивировались фенолметилсульфонилфторидом, дифенилкарбамоилхлоридом и ингибиторами трипсина из фасоли и клубней картофеля. Карбоксильные протеазы *T. viride* с рI 4,3 были стабильны при рН 3-6 (Гайда и др., 1981б).

Янгом с соавторами выделена и очищена экстрацеллюлярная сериновая протеаза (PrC) из *Gliocladium roseum* (CGMCC 0806). Протеаза имела MW 33 kDa, рI 10,0, оптимум активности при рН 9-10 и 60°C (10 мин). Очищенная протеаза разрушала казеин, желатин и кутикулу нематод, инактивировалась фенолметилсульфонилфторидом (Yang et al., 2006).

Одна из трех протеаз, обнаруженных у *T. harzianum*, – нейтральная протеаза – присутствовала во всех исследованных супернатантах, в то время как рост микромицета на грибных клеточных стенках стимулировал синтез и/или секрецию основной протеазы *prb1*. В отличие от коллоидного хитина полимеры ламинарин, пустулан и цинереан не индуцировали секрецию *prb1*. Высокий уровень экспрессии *prb1* отмечен при взаимодействии *T. harzianum*-*R. solanum* или при росте *T. harzianum* на клеточных стенках (Benitez et al., 1998).

Различные виды *Trichoderma* синтезируют и секретируют во внешнюю среду протеазы, которые, возможно, участвуют в инактивации внеклеточных ферментов грибов, патогенных для растений (Маркович, Кононова, 2003).

Так, было показано, что синтез гидролитических ферментов у фитопатогенного гриба *B. cinerea* при инфицировании воздушным путем, на первых стадиях взаимодействия с растением-хозяином, является решающим в процессе инфекции. Эти ферменты включают кутиназу, которая гидролизует эфирные связи полимера кутина, а также пектолитические ферменты, гидролизующие клеточные стенки. Прорастание конидий *B. cinerea* на поверхности листьев фасоли ингибировалось штаммами *Trichoderma*, при этом ингибирующий эффект был выше у *T. harzianum* Т39. Этот штамм ингибировал у *B. cinerea* активность кутинэстеразы, экзополигалактуроназы, эндополигалактуроназы, пектинметилэстеразы, пектатлиазы, за исключением карбоксиметилцеллюлазы при совместном выращивании вместе с *T. harzianum* либо в жидкой культуре, либо на поверхности листьев фасоли. Предполагают, что ингибирующее влияние *T. harzianum* на ферментативную активность *B. cinerea* могло быть обусловлено секрецией протеолитических ферментов, которые инактивируют гидролитические ферменты *B. cinerea* и тем самым снижают патогенность последнего (Elad et al., 1999).

Дунаевским (Дунаевский и др., 2000) были выделены из ростовой среды *T. harzianum* внеклеточные протеазы, принадлежавшие к семейству субтилизиновых сериновых протеаз. Ферменты синтезировались *de novo* при появлении в среде белкового субстрата. Спектр и активность протеаз зависела от содержания углерода в среде. Идентификация секретируемых протеаз *T. harzianum* при указанных условиях культивирования и поиск предпочтительного для них субстрата выявили присутствие в культуральной жидкости как эндопептидазной, так и экзопептидазной (аминопептидазной) активностей. Как видно из рисунка 2.12, в культуральной жидкости гриба в наибольшем количестве представлена активная протеиназа в реакции гидролиза синтетического субстрата Z-ААЛПА. С целью выяснения влияния внешних факторов на максимальный синтез секретируемого фермента была изучена связь условий культивирования гриба и состава среды с изменениями внеклеточного уровня активности протеазы.



Рис. 2.12. Относительная активность протеолитических ферментов в культуральной жидкости *T. harzianum* при гидролизе различных субстратов (рис. адаптирован из Дунаевский и др., 2000).

Азотное питание грибов осуществляется по смешанному типу, т.е. они могут использовать как неорганические источники азота, так и органические азотистые вещества. Только введение в среду белка (казеина) приводило к появлению у *T. harzianum* внеклеточной протеолитической активности. При этом внесение в среду культивирования ингибитора трансляции белков циклогексимида (8 мкг/мл) вызывало практически полное исчезновение протеолитической активности в среде, что свидетельствует о синтезе *de novo* ферментов, ответственных за изучаемую активность. Таким образом, как и в случае с *Alternaria alternata* и *Fuzarium oxysporum*, присутствие в среде культивирования белкового субстрата оказалось обязательным условием для синтеза и последующей секреции грибом протеолитической активности (Дунаевский и др., 2000).

Изучение зависимости содержания внеклеточной протеиназы, активной при гидролизе Z-ААЛПА, от концентрации белка в культуральной среде показало, что 1%-ный казеин вызывает максимальную стимуляцию синтеза исследуемого фермента (табл. 2.7). Общая активность фермента, рассчитанная на 1 г сухого мицелия, свидетельствует о том, что в этом случае наблюдается специфическая стимуляция синтеза протеиназы, а не увеличение ее содержания, обусловленное увеличением роста мицелия (Дунаевский и др., 2000).

Т а б л и ц а 2.7

Влияние количества казеина в среде на содержание секретируемой протеиназы *T. harzianum*

Концентрация казеина, %	Общая активность, мкмоль/мин	Общая активность/вес сухого мицелия, мкмоль/мин г
0,1	16,9	21,3
0,5	13,5	17,0
1,0	60,5	69,1
2,0	32,4	19,8
2,5	33,6	18,7
3,0	25,4	20,1

Ранее было показано, что углеводы в культуральной среде могут оказывать заметное влияние на синтез секретируемых ферментов. В случае *T. harzianum* замена одного сахара в среде на другой приводила к изменениям как цвета культуральной жидкости и внешнего вида мицелия, так и количественного и качественного составов внеклеточных протеаз (табл. 2.8). Результаты определения общей активности и активности, рассчитанной на 1 г сухого мицелия, показали, что сахароза и глюкоза

предпочтительны для синтеза и секреции протеиназ, активных по Z-ААЛПА и СФПА, в то время как лактоза давала максимальный выход протеиназы, активной по белковому субстрату-казеину. В отличие от других сахаров, в присутствии мальтозы и арабинозы не наблюдалось синтеза фермента, активного по СФПА, а в присутствии глюкозы отсутствовала внеклеточная аминопептидазная активность (Дунаевский и др., 2000).

Т а б л и ц а 2.8

Влияние углеводов в культуральной среде на секретируемую протеолитическую активность *T. harzianum* (рассчитанные в мкмоль/мин на г сухого веса мицелия)

Углеводы	Активность по Z-ААЛПА	Активность по БАПА	Активность по СФПА	Активность по ЛПА	Активность по казеину
Сахароза	69,5	1,1	1,9	14,9	25,3
Лактоза	58,9	0	0,7	6,0	38,9
Мальтоза	32,1	0	0	3,7	16,4
Глюкоза	57,0	0	4,7	0	0
Арабиноза	49,4	0	0	3,2	11,1
Без углеводов	20,6	2,5	1,2	5,5	0

Механизм влияния углеводов на изменения количества и/или появление новых протеаз пока не ясен. Возможно, некоторые из сахаров влияют на связывание определенных последовательностей, присутствующих в промоторных областях генов этих ферментов, что приводит к активации их транскрипции. Такой механизм может использоваться грибом для тонкой и быстрой адаптации к изменяющимся условиям внешней среды. Определение динамики изменения активности внеклеточных протеаз, секретируемых *T. harzianum* при глубинном культивировании на модифицированной среде Чапека (с казеином в качестве единственного источника азота), показало, что активность при гидролизе Z-ААЛПА достигает максимальной величины на 7-е сутки культивирования. В это время в заметных количествах была представлена только аминопептидазная активность, тогда как другие активности были незначительны. Поэтому культуральная жидкость 7-суточной культуры и была использована для выделения преобладающего протеолитического фермента (Дунаевский и др., 2000). Данные по очистке внеклеточной протеазы *T. harzianum* суммированы в таблице 2.9. Таким образом, исследуемая протеаза *T. harzianum* была очищена в 322 раза и получена с выходом 7,2%.

Т а б л и ц а 2.9

Очистка внеклеточной протеазы из культуральной жидкости *T. harzianum*

Стадии очистки	Количество белка, мг	Удельная активность, ед/мг	Общая активность, ед	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	413	0,17	70,2	1	100
Осаждение сульфатом аммония, центрифугирование, диализ	65	0,72	47	4,2	67
Аффинная хроматография на бацитрацин-силохроме	2,46	6,05	14,9	36,5	21,2
Ионообменная хроматография на Mono Q (FPLC)	0,092	54,78	5,04	322,2	7,2

Молекулярная масса очищенного фермента составляла 73 кДа, а ИЭТ – 5,35.

Результаты анализа функциональных групп активного центра исследуемого фермента приведены в таблице 2.10. Только ингибитор сериновых протеаз, фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), полностью ингибировал активность выделенной протеазы *T. harzianum*, измеренной как по реакции гидролиза Z-ААЛПА, так и по реакции гидролиза казеина. При этом на изучаемую активность незначительное влияние оказывали ингибиторы сериновых протеиназ: трипсина (тозил-L-лизин хлорметилкетон, ТЛХК) и химо-трипсина (тозил-L-фенилаланин хлорметилкетон, ТФХК) и практически не влияли ингибиторы других классов протеаз (Дунаевский и др., 2000).

Т а б л и ц а 2.10

Влияние различных ингибиторов на активность внеклеточной протеазы *T. harzianum*

Реагент	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %	
		По Z-ААЛПА	По казеину
Без реагента		100	100
ЭДТА	10	92	105
О-фенантролин	6	98	109
ФМСФ	0,1	7	15
	0,5	0	0
ТЛХК	1	101	91
ТФХЛ	0,5	81	93
	1	59	83
ПХМБ	1	100	100
Йодацетат	1	100	105
Йодацетамид	1	100	96
Дитиотреитол	1	93	99
Пепсатин	0,01	100	100

Изучение зависимости величины активности фермента от рН при использовании как Z-ААЛПА, так и казеина выявило два максимума – при рН 7,5 и 10,0. Сходный характер зависимости был обнаружен при исследовании внеклеточной протеиназы *Paracoccidioides brasiliensis*, имеющей оптимумы рН при 5,5 и выше 9,5. Однако остается неясным, является ли это свойством самого фермента или наличие двух оптимумов рН обусловлено присутствием двух форм фермента с одинаковой специфичностью и близкой организацией активного центра, но различающихся оптимумом рН действия. Изучаемая протеаза была стабильна в пределах рН 6-11, теряла до 25% своей активности при рН 4-6 (при использовании БАПА в качестве субстрата) и полностью инактивировалась при рН ниже 3,9. Температурный оптимум активности секретлируемой протеазы *T. harzianum*, измеренной при рН 8,0, был в районе 40° (Дунаевский и др., 2000).

Очищенный фермент обладал узкой субстратной специфичностью: он хорошо гидролизировал только субстраты субтилизиноподобных протеаз и был неактивен по отношению к субстратам трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеаз, а также аминопептидаз и карбоксипептидаз. Секретлируемая протеаза *T. harzianum* предпочитала наличие у использованных субстратов остатка лейцина в положении Р₁ и практически не гидролизовала короткие субстраты, содержащие один аминокислотный остаток (Ас-Тур-рNa и СФПА). При этом исследуемому ферменту был важен не только аминокислотный остаток, по которому происходило расщепление субстрата, но и соседние аминокислотные остатки. Так, замена аланина на глицин в положении Р₃

приводила к 20-кратному снижению эффективности гидролиза. Узкая субстратная специфичность выделенной протеазы, а также совпадение результатов по исследованию активного центра с помощью ингибиторного анализа, полученных с использованием специфического синтетического субстрата субтилизина (Z-ААЛПА) и неспецифического белкового субстрата казеина, могут служить подтверждением отсутствия загрязненности изучаемой протеазы *T. harzianum* другими протеолитическими ферментами.

Таким образом, совокупность данных по физико-химическим характеристикам и субстратной специфичности показала, что очищенный из культуральной среды гриба *T. harzianum* внеклеточный протеолитический фермент является сериновой протеазой субтилизинового типа (Дунаевский и др., 2000).

Среди штаммов *T. harzianum*, колонизирующих почвы под растениями какао в Бразилии, выделен штамм-суперпродуцент щелочной протеазы 18,8 КДа. Максимум секреции протеазы наблюдали через 48 ч после контакта антагониста с клеточными стенками и мицелием *Cripinellis pernicioso*. В полевых условиях воздействие литического комплекса антагониста приводит, вероятнее всего, к перфорации клеточных стенок фитопатогена и гибели мицелия на растениях какао. Однако открытым остается вопрос об истинном индукторе протеазы *in vivo*.

2.1.5. Хитинолитические ферменты и их гены

Хитин, (1,4)- β -гомополимер N-ацетил-D-глюкозамина, является самым широко представленным полимером в биосфере, и хитинолитические ферменты обнаружены у представителей всех царств: у простейших, бактерий, грибов, растений, беспозвоночных и позвоночных животных, в том числе, и у человека (Kubicek et al., 2001). Ферменты гидролиза хитина являются частью многих биологических процессов, таких, как автолиз, морфогенез и питание, кроме того, микопаразитизм играет определенную роль во взаимоотношениях между грибами и другими организмами, такими, как растения и насекомые. Образование хитиназ установлено для многих грибов и видов, таких, как *T. harzianum*, которые используются как коммерческие продуценты (например, препараты «литических ферментов» L2773 и L2265 фирмы Sigma). Цитолитические штаммы *Trichoderma* являются одними из наиболее эффективных агентов биологического контроля заболеваний растений. Проявление этих особенностей связывают с продукцией хитиназ.

2.1.5.1. Хитинолитические ферменты *Trichoderma*

Номенклатура хитиназ

Номенклатура хитинолитических ферментов весьма размыта и неадекватна для систематизации хитинолитических систем *Trichoderma* (табл. 2.11). Рекомендуемая номенклатура не разделяет экзо- и эндоферменты. Определение хитиназной активности как способности гидролизовать 1,4- β -связи N-ацетил- β -D-глюкозамина в хитине и хитодекстрине включает только эндохитиназную активность и не касается экзоферментов, катализирующих отщепление только диацетилхитобиозы с нередуцирующихся концов хитиновых цепей. Энзимы, катализирующие отщепление только N-ацетилглюкозамина в виде мономера с нередуцирующегося конца цепи, можно резонно отнести к другому классу экзохитинолитических ферментов, но изначально они классифицировались как хитобиозы, затем как β -N-ацетилгексозаминидазы (ЕС 3.2.1.52) (Lorito, 1998).

Таким образом, только два названия хитинолитических ферментов рекомендованы сегодня – эндохитиназа (ЕС 3.2.1.14) и β -N-ацетилглюкозаминидаза (ЕС 3.2.1.52), но существуют проявления, по крайней мере, трех различных типов

хитиноподобной активности (табл. 2.11). Это также касается хитиноподобных ферментов *Trichoderma*, которые хаотически разрывают связи внутри цепи хитина и отщепляют одиночные N-ацетилглюкозамины или одиночные диацетилхитобиозы от нередуцирующегося конца (Lorito, 1998).

Таблица 2.11

Хитиназы и гены *Trichoderma* в базах данных (Lorito, 1998)

Ген/ фермент	Число сиквенсов в базах данных
chit42 (эндохитиназа)	64
chit33 (эндохитиназа)	2
nag1 (хитобиозидаза)	2
nag2 (хитобиозидаза)	2
exs1 (экзохитиназа)	1
exs2 (экзохитиназа)	1
ech2	2
ech3	2
ech3B	2
cht1	3
cht2	2
chit33 (эндохитиназа)	2
chit36Y	2
chit-VIRI	1
chit-P	1
chit-HAM	1
chit-HAR1	1
chit-HAR2	1
chit-HAR3	1
chit-G2	1

Все ферменты, способные к гидролизу хитина или хитоолигомеров, разрывом 1,4-β-связи N-ацетил-β-D-глюкозамина определены как хитиноподобные и дифференцированы согласно конечным продуктам реакции. Используемая терминология учитывает описанные различия и рекомендации Номенклатуры ферментов:

- Эндохитиназа – соответствует определению «хитиназа» в Номенклатуре Ферментов. Она хаотически разрушает хитин и хитоолигомеры и создает смесь растворимых низкомолекулярных конечных продуктов различных размеров. Основным конечным продуктом является диацетилхитобиоза, так как она не может быть далее расщеплена. Таким образом, рекомендованный термин «хитиназа» подразумевает только эндохитиназную активность.

- Хитин 1,4-β-хитобиозидаза (хитобиозидаза) – новое название для уже хорошо описанной экзохитиназной активности (рис. 2.13). Она расщепляет хитин и хитоолигомеры с нередуцирующегося конца и освобождает одиночные (GlcNAc)₂. Термин «хитобиозидаза» не является официально рекомендованным ЕС, он аналогичен целлюлитическому ферменту – целлюлоза 1,4-β-целлобиозидаза – и более предпочтителен, чем «хитобиогидролаза». Хитобиозидазы *Trichoderma* охарактеризованы с различных сторон и отличаются во многом от других хитиноподобных ферментов субстратной специфичностью, аминокислотной последовательностью, антигрибной активностью, серологическими свойствами и другими характеристиками.

• β -N-ацетилгексозаминидаза – фермент, расщепляющий хитоолигомеры и хитин с нередуцирующегося конца и освобождающий одиночные N-ацетилглюкозаминные мономеры. Таким образом, это экзохитиназа. Только этот фермент способен расщепить $(\text{GlcNAc})_2$. Синоним «хитобиоза» лучше не использовать, потому что он может быть спутан с хитобиозидазой и термины, подобные N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, более не рекомендованы номенклатурой ферментов (Lorito, 1998).

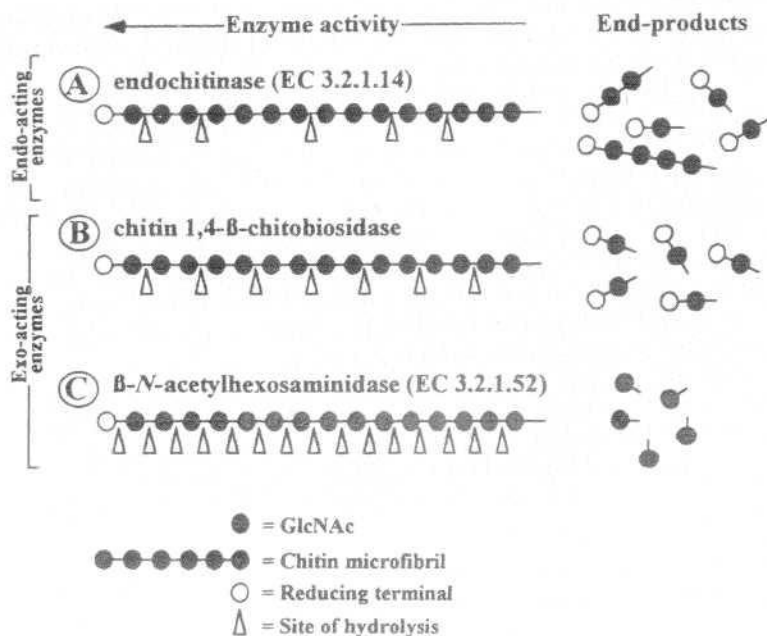


Рис. 2.13. Механизм функционирования хитиназ *Trichoderma* (рис. адаптирован из Lorito, 1998).

Субстраты, используемые для исследования чистоты и характеристики хитинолитических энзимов из *Trichoderma*, включают р-нитрофениловые хитоолигомеры, различно очищенные хитины грибных клеток, производные 4-метилумбеллифериловых производных и некоторые другие субстраты (Murad et al., 2006). Однако использование очищенного хитина и синтетических субстратов может влиять на специфическую ферментативную активность по причине их «ненатурального» взаимодействия с каталитическими центрами (Lorito, 1998).

Гетерогенность комплекса ферментов хитиназ *Trichoderma*

В настоящее время в хитинолитической системе *Trichoderma* некоторые из энзимов после очистки до гомогенности охарактеризованы. Хитинолитические энзимы обнаружены в *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. longipilis*, *T. minutisporum*, *T. hamatum* и *T. reesei*, но наиболее изучена хитинолитическая система *T. harzianum*. При фракционировании бесклеточного экстракта комплексная система, состоявшая из разнообразных хитинолитических ферментов, была определена как совокупность составляющих ферментов. По MW на SDS-PAGE энзимы *T. harzianum* можно разделить на следующие две основные группы, которые могут быть обозначены как: группа 1, включающая энзимы с молекулярной массой около 60-70 kDa или выше, которые отнесены к β -N-ацетилгексозаминидазам, и группа 2, включающая энзимы с более низкой MW, в основном эндохитиназы. Возможно, группа 2 может в дальнейшем быть преобразована в группу 2A, содержащую эндохитиназы и хитобиозидазы с MW выше, чем 40 kDa и группу 2B с MW меньше 40 kDa, состоящую в основном из эндохитиназ (Lorito, 1998).

Некоторые ферменты, кажущиеся разными, могут в действительности быть

одинаковыми белками, и различия в MW могут быть вызваны различием методов разделения.

Различия в наборе ферментов среди разных штаммов *Trichoderma* трудно оценить по имеющимся данным, также до сих пор неизвестна роль многих отдельных ферментов. Например, штамм *Trichoderma harzianum* TM секретирует, по меньшей мере, 6 различных хитинолитических ферментов, но не синтезирует хитобиозидазы. Обычно определяются N-ацетилгексааминидазы из первой группы и некоторые эндохитиназы из второй группы (Lorito, 1998).

Все белки, составляющие хитинолитическую систему *Trichoderma spp.*, все еще не идентифицированы и/или охарактеризованы, хотя некоторые ферменты очищены до гомогенного состояния и их биохимические и биологические особенности изучены. В таблице 2.12 представлены данные об идентифицированных ферментах хитинолитических систем *Trichoderma sp.* и приведены молекулярные веса по результатам электрофореза в полиакриламидном геле (Kubicek et al., 2001).

Т а б л и ц а 2.12

**Белки с хитиназной активностью, выделенные из *Trichoderma spp.*
(Kubicek et al., 2001)**

Виды	Штамм	Тип хитиназы	KDa
<i>T. harzianum</i>	СЕСТ 2413	Эндохитиназа	42
<i>T. atroviride</i>	P1	Эндохитиназа	42
		хитобиозидаза,	40
		N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза	73
<i>T.cf.harzianum</i>	Nottingham39.1	Эндохитиназа,	42
		N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза	64
<i>T.cf.harzianum</i>	Nottingham39.1	Эндохитиназа	46
<i>T.cf.harzianum</i>	NottinghamT198	Экзохитиназа	28
<i>T.cf.harzianum</i>	AF6-T8	N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза	69

Очевидно, что чаще всего выделяли гомологи эндохитиназы 42 kDa и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу с MW 70-73 kDa. Данное обстоятельство можно объяснить тем, что эти два фермента чаще всего обнаруживаются в культуральной жидкости *Trichoderma spp.*, когда грибы выращиваются в среде с клеточными стенками в качестве источника углерода. Затем были выделены эндохитиназа 37 kDa и 33 kDa, хитобиозидаза 40 kDa и 28 kDa экзохитиназа. С помощью флюоресцентного окрашивания гелей были идентифицированы дополнительные ферменты, например, N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза с MW 102 kDa (цит. по Kubicek et al., 2001). Недавно выделена новая хитиназа СНТ101 из *T. atroviride* T11 (Vizcaíno et al., 2006).

Следует отметить, что среди ферментов, обозначенных как «эндохитиназы», только эндохитиназа *T. harzianum* с MW 33 kDa катализирует образование конечных продуктов, главным из которых является хитотетраозид, и минорными продуктами являются хитотриоза и хитобиоза. Особенностью этого фермента является тот факт, что, в отличие от других эндохитиназ *Trichoderma spp.*, этот фермент практически не гидролизует p-нитрофенол-β-D-хитобиозид (Kubicek et al., 2001).

Существует несколько главных проблем в использовании полученных данных для описания разнообразия хитиназного спектра *Trichoderma spp.* Во-первых, секретируемые ферменты, такие, как хитиназы, возможно, подвергаются протеолизу в культуральной жидкости. Установлено, что данное обстоятельство является главным камнем преткновения для понимания энзимологии целлюлаз *T. reesei*. Опубликованы данные, убеждающие в том, что, по крайней мере, одна из хитиназ – эндохитиназа-42 kDa, – обнаруживаемая в культуральной жидкости *Trichoderma spp.*, присутствует в

форме, подвергшейся протеолизу (Kubicek et al., 2001). Во-вторых, большинство ферментов были очищены из фильтратов различных изолятов, определяемых как *T. harzianum*, которые в дальнейшем были переидентифицированы, как другие виды (Hermosa et al., 2000). Кубичеком (Kubicek, 2001) была изучена таксономическая идентичность 8 изолятов *T. harzianum*, которые широко использовались для изучения физиологии, биохимии и молекулярной генетики видов *Trichoderma*, используемых как биофунгициды, путем сиквенирования и анализа сиквенсов рДНК (ITS1 и ITS2), сиквенса малой субъединицы митохондриальной ДНК (mtSSUrDNA) и части гена, кодирующей эндохитиназу-42 (*ech42*). Анализ полученных филогенетических деревьев, свидетельствовал о том, что 8 изучаемых изолятов принадлежат к трем различным видам: *T. harzianum*, *T. atroviride* и *T. asperellum*. Все 8 штаммов секретируют эндохитиназу 42 kDa и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу 73 kDa в культуральную жидкость. Однако использование праймеров для выявления консервативного сиквенса *chit33* показало, что ПЦР фрагменты этого гена были обнаружены только у *T. harzianum* и у очень близких к этому виду изолятов. В соответствии с данными, полученными Кубичеком, Шиклер (цит. по Kubicek et al., 2001; Schickler et al., 1998) показал, что хитиназы могут различаться у разных штаммов одного вида *T. harzianum*. Это подтверждает мнение, согласно которому разные виды (и разные популяции одного вида) *Trichoderma spp.* могут различаться по спектру хитиназ, а также и по свойствам хитиназ (Murad et al., 2006).

2.1.5.2. Регуляция экспрессии генов хитиназ

Механизм индукции

Высокий уровень индукции внеклеточных хитинолитических ферментов обычно получается при росте *Trichoderma* на очищенном хитине, грибных клеточных стенках или мицелии в качестве источника углерода. Индукция хитиназ значительно снижена или отсутствует *in vitro* на таких средах, как хитозан, целлюлоза, неочищенный хитин или ламинарин. Однако разные энзимы могут иметь разные механизмы индукции. N-ацетилглюкозамин, например, специфически индуцирует β-N-ацетилгексозаминидазу, но не эндохитиназу или хитобиозидазу в *Trichoderma harzianum* (Lorito, 1998).

Образование большинства хитинолитических ферментов *in vitro* репрессируется возрастающим количеством глюкозы, сахарозы и конечными продуктами, что дает основания считать, что синтез ферментов специфически регулируется катаболитной репрессией. Существуют данные о катаболитной репрессии глюкозой экспрессии генов *chit42/ech42*. Это детально изучено у эндохитиназы СНТ42 *T. harzianum*, кодируемой геном *ThEn-42*, которая активизируется при микопаразитическом взаимодействии.

Ранее было предположено, что на гене эндохитиназы-42 существуют два различных сайта в области промотора, с которыми взаимодействует углеродный катаболитный репрессор CRE1 в случае микопаразитизма в среде с глюкозой и олигосахаридами. По-видимому, подобная регуляция наблюдается в случае мультикопийного гена эндохитиназы-42 у *T. reesei*. Многие авторы также сообщали о репрессии глюкозой *chit42* также на уровне мРНК, и есть основания полагать, что репрессор углеродного катаболизма CRE1 вовлечен в этот процесс (Lorito et al., 1998; Kubicek et al., 2001).

Несмотря на то, что основные моменты о механизмах экспрессии хитиназы *T. harzianum* изучены, мало известно о факторах, влияющих на продукцию N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (NAG). Описано, что NAG-гликопротеин синтезируется *T. harzianum* в присутствии хитина и N-ацетилглюкозамина. Синтез энзима в хитин-содержащих средах *T. harzianum* зависел от добавок глюкозы и N-ацетилглюкозамина. Авторы показали, что синтез регулируется механизмами индукции и катаболической репрессии. Несколько предположений сделаны о механизме проявления индукции нерастворимым хитином. Некоторые авторы предполагают, что индукции вызывают

олигомерные хитины, которые выделяются при гидролизе нерастворимого субстрата хитиназамин и NAG или выделяются из собственной клеточной стенки. Другое предположение в том, что индуцирующий сигнал, является результатом физического контакта между клеточной поверхностью и нерастворимым субстратом. Однако природа индуктора и репрессора до конца не ясна, не ясны вторичные посредники, особенно роль cAMP (циклический аденозин монофосфат) в этом механизме (Silva et al., 2004).

Среди выявленных у высших эукариотов и дрожжей сигнальных путей, по крайней мере три выявлены у *Trichoderma*:

- а) протеин киназа /фосфолипидный путь;
- б) Ca²⁺/ кальмодулин путь;
- в) с AMP /протеин киназа С путь.

Исследована роль cAMP в продукции NAG *T. harzianum* на хитин - содержащих средах и эффект модуляторов клеточных сигнальных систем – кофеина, AlF₄ и динитрофенола (DNP) на экспрессию этого фермента. Известно, что исследуемые модуляторы вызывают различными путями нарастание внутриклеточного уровня cAMP. Установлено, что модуляторы (AlF₄ и DNP) усиливают также и рост грибов на 20%. Кофеин влияет на внутриклеточный уровень cAMP и фермента NAG, т.к. является ингибитором cAMP-фосфодиэстеразы. Таким образом, кофеин, является известным стимулятором уровня внутриклеточного cAMP в эукариотических клетках, включая грибы. Ион-активатор G-белка AlF₄ формирует комплекс сGDP. AlF₄, будучи добавленным в индукционную среду, также увеличивал уровень с AMP и уменьшал активность с NAG. Сходные результаты получены для клеток дрожжей (Silva et al., 2004).

Показано, что секреция NAG *T. harzianum* уменьшается в ответ на повышение внутриклеточного cAMP. По данным ПЦР-анализа предварительно клонированного гена *nag* ошутимое снижение уровня транскрипции получено уже через 48 часов инкубации с глюкозой, кофеином, AlF₄ и DNP. Некоторые авторы показали, что cAMP вовлечен в контроль разных функций гриба *Trichoderma*: экспрессия хитиназ, развитие конидий, морфогенезис (цит. по Silva et al., 2004). Отмечено влияние освещенности на биохимические изменения, такие как быстрый рост внутриклеточного АТФ и cAMP: при освещении мицелия *T. viride*, росшего в темноте, стимулировался конидиогенез (колонии, росшие в темноте, образовывали меньше конидий, чем в условиях освещения). Также показано, что модуляторы или аналоги cAMP, повышающие внутриклеточный уровень cAMP, индуцировали обвивание *Trichoderma* вокруг нейлоновой сетки. Таким образом, низкий уровень внутриклеточной cAMP приводит к возрастанию экспрессии *ech42*, тогда как высокий уровень уменьшает экспрессию этого гена при микопаразитизме (Silva et al., 2004).

Изучено действие на синтез N-ацетилглюкозаминидазы (NAGase) модуляторов G белка и cAMP штамма *Trichoderma harzianum* в течение 84 ч при росте на хитин-содержащей среде. Показано, что кофеин (5 мМ), N⁶/42'-О-дибутириладенозин 3'5'-циклический монофосфат натриевой соли (dBcAMP) (1 мМ) и 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX) (2 мМ) снижали экстрацеллюлярную активность NAGase на 80%, 77% и 37%, соответственно. AlCl₃/KF (100 μМ/10 мМ и 200 μМ/ 20 мМ) снижал активность на 85% и 95%, соответственно. Токсины холеры (10 μ/mL) и коклюша (20 μ/mL) также влияли на активность NAGase, приводя к снижению приблизительно на 75%. Отмечалось сокращение длины белковых цепей: 73 kDa, 68 kDa и 45 kDa под действием обработок, в то время как белок с молекулярной массой 50 kDa увеличивался при обработке токсинами холеры и коклюша. Анализ N-терминирующей последовательности показал, что белки с молекулярной массой 73 kDa и 68 kDa являются двумя разными формами NAGase *T. harzianum*, поскольку полипептид 45 kDa является эндохитиназой *T. harzianum*. Белок с молекулярной массой 50 kDa показал

сходство последовательности с целлюбиогидролазой *Coriolus vesicolor*. Полученные результаты позволили авторам предположить, что в синтезе хитиназы *T. harzianum* может участвовать сигнальный путь, включающий G-белки, аденилатциклазу и сАМР.

В заключение необходимо сказать, что уникальный механизм индукции хитинолитических ферментов окончательно не изучен.

Продукция, очистка и характеристика

Хитинолитические ферменты *Trichoderma* эффективно продуцируются на разнообразных субстратах, содержащих основные минеральные соли, источники углерода и азота. В последние несколько лет ферменты были очищены до гомогенного состояния и характеризованы у нескольких видов. Комбинации таких стандартных методов, как аффинная хроматография, гельхроматография, хроматофокусирование, изоэлектрическое фокусирование, электрофорез, ВЭЖХ, осаждения сульфатом аммония и т.д., позволяют добиться высокой степени чистоты. Большинство выделенных ферментов хитинолитической системы *Trichoderma harzianum* очищены, за исключением СНТ52, СНТ31, СНТ102 (Lorito, 1998).

Физико-химические свойства очищенных хитинолитических энзимов из *T. harzianum* и *T. virens* типичны для этих видов энзимов.

Параметры хитиназ:

А. MW от 20 – 100 кDa;

В. высокая стабильность;

С. рН оптимум 4.0 - 5.5;

t° оптимум 40⁰ - 60⁰ С;

Д. чувствительность к некоторым протеазам;

Е. энзиматическая активность не требует ко-фактора и не проявляет сильной зависимости от ионов металлов, за исключением Zn²⁺, EDTA и высокой ионной силы;

Ф. термоустойчивость, за исключением СНТ52 и СНТ102;

Д. отмечена общая устойчивость ферментативной активности к высушиванию, замораживанию, хранению в водном растворе при комнатной температуре или внутри клетки хозяина, включая грибы, дрожжи, бактерии и растения (Lorito, 1998).

Субстратная специфичность хитинолитических энзимов из *Trichoderma* носит комплексный характер. Эндохитиназы, хитобиозидазы и β-N-ацетилгексозаминидазы могут действовать на коллоидный хитин очищенной клеточной стенки, хитоолигомеры и менее активны к неочищенному хитину краба. Хитин и хитиновая клеточная стенка лучше деградируются эндохитиназами, чем хитобиозидазами или β-N-ацетилгексозаминидазами. Хитоолигомеры расщепляются всеми тремя энзимами, но β-N-ацетилгексозаминидазы действуют более быстро применительно к коллоидной суспензии хитина; (GluNAc)₂ – хороший субстрат для β-N-ацетилгексозаминидазы, но не разрывается эндохитиназами или хитобиозидазами и может быть применен для различения эндохитиназной или хитобиозидазной и β-N-ацетилгексозаминидазной активностей. Более того, выделение только GluNAc, только (GluNAc)₂ или смеси конечных продуктов различного размера позволяют различить β-N-ацетилгексозаминидазную, хитобиозидазную и эндохитиназную активности, соответственно (Lorito, 1998).

Выход очищенных экстрацеллюлярных энзимов из *Trichoderma* обычно несколько миллиграммов с литра культуры, хотя добавление экстракта дрожжей, протеолитического пептона или поливинилпирролидона к хитин-солевой среде может повысить уровни энзимов. Выделенный штамм-сверхпродуцент *Trichoderma reesei* *ThEn-42* обладает 20-кратно увеличенным уровнем экстрацеллюлярного энзима СНТ42. В нескольких лабораториях проводятся исследования по экспрессии генов, кодирующих β-N-ацетилгексозаминидазу и СНТ42 в дрожжах, мутированных для высокой продукции экстрацеллюлярных гидролаз. Практическое значение исследований:

- Будут получены дополнительные данные об аминокислотной последовательности, субстратной специфичности, продуктах реакции, молекулярной структуре и механизме гидролиза, которые необходимы для полного понимания сложности и комплексности этой хитинолитической системы.
- Помогут найти полезные применения этим ферментам (Lorito, 1998).

Гены хитинолитических ферментов

Клонирование и сиквенирование генов, кодирующих хитинолитический фермент *Trichoderma*, имеют большое значение по следующим причинам:

A. Клонирование генов хитиназ позволило очистить и охарактеризовать ферменты.

B. Кодирующая последовательность относительно мала, и поэтому с ней легко работать.

C. Транскрипция может индуцироваться на высоком уровне с использованием соответствующих субстратов и/или грибной ткани хозяев.

D. Гены, вероятно, находятся внутри одного локуса в виде единственной копии и демонстрируют некоторую гомологичность со сходными генами из других организмов.

E. Клонированная последовательность может экспрессироваться в других грибах, дрожжах, бактериях и растениях для синтеза модификаций фермента, разлагающего лигнин (Lorito, 1998).

Клонирование генов

Возможно, что клонирование генов представляет собой более удобный метод изучения разнообразия хитиназ.

Первым был клонирован ген *Trichoderma harzianum*, кодирующий СНТ42, вероятно потому, что это наиболее распространенный фермент, синтезируемый при индукции хитином. Этот ген был клонирован из штаммов P1, СЕСТ 2413, IM206040, T 25-t и назван *ThEn-42*, *chit42*, *ech-42* и *chl*, соответственно. Ген, кодирующий другую хитиназу СНТ33, также был клонирован из штамма СЕСТ 2413 и назван *chit33*. Среди экзоферментов кодирующая последовательность СНТ72 также была клонирована из штамма P1 и названа *nag1* и из штамма T 25-t и названа *exc1*. Последовательность, кодирующая β-N-ацетилгексозаминидазу, названная *exc2*, сходная с *exc1*, была клонирована из T 25-t и она, возможно, кодирует новую гексозаминидазу. Другие клонированные гены включают *tham-ch*, кодирующие СНТ42 из *Trichoderma hamatum* и две эндохитиназы из штамма 41 *Trichoderma virens*. Гены хитинолитических ферментов *Trichoderma* кодируют белки длиной 320-600 аминокислотных остатков. Все последовательности содержали высокогидрофобную NH₂-концевую аминокислотную последовательность, которая может представлять сигнальную последовательность для осуществления секреции фермента (Lorito, 1998).

Представлено, по крайней мере, 4 группы генов, кодирующие хитиназы:

1) эндохитиназу (*chit42* и 2 разновидности *chit33*), 2) 2 гена, кодирующие хитобиозидазу (*Nag1* и *Nag2*), 3) 2 гена, кодирующих экзохитиназы (*Exc1* и *Exc2*), и 4) 13 генов, кодирующих не охарактеризованные хитиназы (Rey et al., 2001). Предполагают, что хитинолитическая система грибов рода *Trichoderma* состоит из 5-7 различных ферментов, в зависимости от штамма. Обычно система состоит из двух β-(1,4)-N-ацетилглюкозаминидаз (102 и 73 kDa) и четырех эндохитиназ (52, 42, 33 и 31 kDa). Показано, что эндохитиназа 42 kDa *in vitro* катализирует гидролиз клеточных стенок *Botrytis cinerea*. Более того, индукция соответствующего гена ассоциирована с атакой паразитического гриба. Предполагают, что ген эндохитиназы-42 играет главную роль в микопаразитизме (Garsia et al., 1994; Carsolio et al., 1999).

Клонированные гены хитиназ представлены в таблице 2.13 (Kubicek et al., 2001). Ген, кодирующий эндохитиназу-42, обладает высокой степенью гомологии с генами

эндохитиназ других видов грибов, в том числе с *Aphanocladium sp.* (Blaiseau, Lafai, 1992), и клонируется чаще других хитиназных генов. Соответствующий сиквенс гена *ech42* различных видов *Trichoderma* различается на 35%, а аминокислотная последовательность на 17%. Обнаруженная разница коррелирует с филогенетической дистанцией между исследованными видами (Kullnig - Gradinger et al., 2002). Лекфельд показала, что ген эндохитиназы-42 очень удобен для проведения филогенетического анализа рода *Trichoderma* (Lieckfeldt et al., 2000). Леон с соавторами экспрессировали ген *ech42 T. harzianum* в *E. coli* с использованием экспрессионной системы pET-19b (León et al., 2004). В более ранних исследованиях дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* секретировали функционально активную форму эндохитиназы 1 (Draborg et al., 1997).

Ген *chit33 T. harzianum* не был гомологичен ни одному гену грибов (Limon et al., 1995). Однако ген был гомологичен защитным хитиназам растений. Используя праймеры к части гена, кодирующей консервативные домены белка, Кубичеку (Kubicek et al., 2001) удалось амплифицировать соответствующие фрагменты из других видов рода *Trichoderma*, филогенетически близких к *T. harzianum*, но ни одного амплификона не было обнаружено в геноме *T. atroviride*, *T. viride* и *T. asperellum*. Значит, либо этот ген встречается только в геноме *T. harzianum* и у близких видов, либо анализ консервативного сиквенса недостаточен для очень удаленных видов, либо ПЦР не получилась. Из *T. harzianum* выделена новая эндохитиназа 36 kDa, на 84% гомологичная хитиназе *Streptomyces coelicolor*. Фермент активен против *Fusarium oxysporum* и *Sclerotium rolfisii* (Viterbo et al., 2001).

Интересно, что ни у одного вида гриба, филогенетически отдаленного от *Trichoderma spp.*, клонированный ген не кодировал домен, присоединяющий хитин.

Клонированы два гена (*exc1* и *exc2*) *T. harzianum*, кодирующие N-ацетил-β-D-гексозаминидазу с MW 64 и 68 kDa (Draborg et al., 1995). Ферменты назвали «экзохитиназами». Установлено, что ферменты гомологичны на 75%. Экзохитиназа с MW 64 kDa имеет 7 сайтов гликолизирования и в результате гликолизирования MW фермента возрастает до 73-75 kDa. Установлено, что ген *exc1* гомологичен однокопийному гену *nag1*, обнаруженному в геноме *T. atroviride* (Peterbauer et al., 1996). По-видимому, экзохитиназа 68 kDa представляет собой уникальное явление, обнаруженное только у штамма, с которым работала Драборг (цит. по Lorito, 1998; Draborg, 1995), считавшая, что ген *exc2* встречается только у *T. harzianum* и у близких видов, поскольку гибридизация ДНК *T. atroviride* в мягких условиях с сиквенсом гена *nag1* показала отсутствие других гомологичных генов. Количество клонированных генов хитиназ все еще ниже, чем число выделенных и очищенных ферментов, что затрудняет установление гена, кодирующего данный фермент. Однако генов, кодирующих хитиназы, существует гораздо больше, чем обнаружено на сегодняшний день. Ким с соавторами (цит. по Lorito, 1998; Kim et al., 1997) сообщил о клонировании 3 хитиназных генов *T. virens*, кроме гена, кодирующего эндохитиназу-42-kDa. Не ясно, гомологичны ли клонированные гены гену *chit33 T. harzianum* или *nag1 T. atroviride*.

Гомологичные последовательности

Все клонированные хитинолитические гены ферментов *Trichoderma* являются копиями одного экземпляра и не содержат перекрестных гибридов с другими ферментами геномов. *ThEn-42*, *ech-42*, *chit42* и *chil*, кодирующие СНИТ42, не имеют идентичных последовательностей с дрожжевыми и растительными хитиназами, но они демонстрируют высокую степень гомологичности с генами бактерий и мицелиальных грибов. Это позволяет предположить, что грибные и бактериальные хитинолитические ферменты развивались из одинаковых генов прокариот.

**Гены хитиназы, клонированные из *Trichoderma spp.*
(Kubicek et al., 2001; Benitez, 2004)**

Ген	<i>Trichoderma spp.</i>	Штамм	Кодируемый белок
<i>th-en42</i>	<i>T. atroviride</i>	P1	42-kDa эндохитиназа
<i>ech42</i>	<i>T. atroviride</i>	IMI206040	42-kDa эндохитиназа
<i>chit42</i>	<i>T. harzianum</i>	CECT2413	42-kDa эндохитиназа
<i>cht42</i>	<i>T. virens</i>	Gv29-8	42-kDa эндохитиназа
<i>th-ch</i>	<i>T. hamatum</i>	Tam-61	42-kDa эндохитиназа
<i>enc1</i>	<i>T. cf. harzianum</i>	T25-1	42-kDa эндохитиназа
<i>chit33</i>	<i>T. harzianum</i>	CECT2413	33-kDa эндохитиназа
<i>nag1</i>	<i>T. atroviride</i>	P1	73-kDa N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза
<i>exc1</i>	<i>T. cf. harzianum</i>	T25-1	73-kDa N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза
<i>exc2</i>	<i>T. cf. harzianum</i>	T25-1	N-ацетил-β-D- глюкозаминидаза

Тем не менее, ген *chit33*, кодирующий эндохитиназу, не демонстрирует сходства с генами прокариот или другими генами *Trichoderma*, за исключением двух консервативных регионов, связанных с активным сайтом. Взамен высокой гомологии обнаружилось соответствие дрожжевых, грибных, растительных последовательностей. β-N-ацетилгексозаминидаза, кодируемая генами *nag1*, *exc1* и *exc2*, имеет значительную гомологию по областям с генами грибов и высших эукариот, меньшее сходство с бактериальными хитиназами и отсутствие сходства с другими генами *Trichoderma* (Lorito, 1998).

Интересно, что гены, кодирующие одинаковые ферменты, при сравнении последовательностей оказываются различными. Ген, кодирующий СНТ42, обнаружен методом Southern-анализа в одной из двух наибольших хромосом миколитических и немиколитических изолятов *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma hamatum*. Большинство последовательностей клонированы. Обращая внимание на сходство некоторых последовательностей, показано: *ThEn-42* из *T. harzianum* P1 была идентична *ech-42* из *T. harzianum* IMI206040 (99% идентичности) и *tham-ch* из *T. hamatum* (94,5% идентичности), но *ThEn-42* значительно отличается от *chit42* из *T. harzianum* CECT 2413 и *chi1* из *T. harzianum* T-25t (*chit42* и *chi1* идентичны друг другу на 97%). Более того, *nag1* из *T. harzianum* P1 примерно на 80% идентичен *exc1*. Ген *chit37* на 87% гомологичен гену *chit36* *T. harzianum* по аминокислотной последовательности (Benitez, 2004).

Теоретически, если гены появляются в различных штаммах, разница в последовательностях может быть использована как молекулярный инструмент для таксономии *Trichoderma* (Lorito, 1998).

Регуляция экспрессии генов и промотеры

De novo было показано наличие регуляции продукции хитинолитических ферментов *Trichoderma* на уровне транскрипции. Управляемая координация между образованием мРНК и фермента была обнаружена для *nag1*, *chit33*, *chit42*, *ech-43*, хотя дополнительная посттранскрипционная регуляция проявляется для *chit33*. Транскрипция всех этих генов сильно индуцируется автоклавированным мицелием, хитином, N-ацетилглюкозамином, а также дерепрессируется глюкозой. Однако некоторые гены регулируются независимо. Независимая транскрипция была получена для *chit42* при индукции хитином или грибной клеточной стенкой (Lorito, 1998).

Экспрессия гена, кодирующего СНТ42, изучена в деталях. К примеру, экспрессия *ech-42* сильно индуцировалась хитином, светом и микопаразитическими взаимодействиями и эффективно репрессировалась глюкозой, как и другие гены.

Клонирована и охарактеризована существенная часть промотера *ThEn-42* из *T. harzianum* P1. Отмечено сильное проявление катаболитной репрессии *ThEn-42*, осуществляющееся посредством *Cre1* по следующим причинам:

А. *Cre1* связывается промотером *ThEn-42*.

В. Он связывается и отделяется от промотера при репрессии и дерепрессии гена, соответственно.

С. Микопаразитическое взаимодействие лишает возможность *Cre1* связываться с промотером даже в присутствии глюкозы, вероятно, по причине того, что с промотером связывается белок микопаразитической природы, действующий как положительный регулятор *ThEn-42* для синтеза СНТ42.

Это исследование представило первый взгляд изнутри на регуляцию экспрессии хитиназы в условиях микопаразитического взаимодействия и стимулировало интерес к этой теме (Lorito, 1998).

Был клонирован ген *T. harzianum*, кодирующий *Cre1*. *In vivo* и *in vitro* проведен функциональный анализ *ThEn-42* и *nag1* промотеров.

Роль хитинолитических энзимов и их генов

Роль хитинолитических энзимных систем *Trichoderma* до сих пор обсуждается. Предполагается, что они вовлечены в морфогенез, антагонизм, микопаразитизм и сапротрофизм, но окончательная роль всех энзимов, к примеру, из результатов экспериментов с деструкцией генов остается неясной (Lorito, 1998).

Интересно, что последовательности ДНК гена эндохитиназы-42 используют для филогенетического анализа рода *Trichoderma* (Liekfeldt et al., 2000). Авторы (Viterbo et al., 2002) предлагают эндохитиназу-36 в качестве молекулярного маркера антагонизма.

Роль в морфогенезе

Грибные хитиназы участвуют в элонгации гифов, в клеточном делении и формировании спорангиеносцев. Экзо- и эндоферменты локализованы внутриклеточно на плазматической мембране, действуют синергически на баланс хитинсинтазной активности. Морфогенетическая роль хитинолитических энзимов *Trichoderma* – до сих пор не исследованная область. Детальное изучение внутриклеточных ассоциированных с мембраной или автолитических, хитинолитических ферментов еще не осуществлено. Обнаружено заметное количество внутриклеточных эндохитиназ и хитинолитическая активность в культуральной жидкости, возможно связанная с автолизом (Vizcaíno et al., 2006). Есть сообщения об обнаружении СНТ102 внутриклеточно при отсутствии индуцирующих условий. В других работах для СНТ42 предполагают морфогенетическую роль в связи с его низким уровнем в разных штаммах, в то время как СНТ33 не выполняет такую роль, так как его последовательность не содержит домен, типичный для энзимов, связывающихся с клеточной стенкой. Подтверждено присутствие гексозаминидазной активности, связанной с клеткой. Это исследование обнаружило высокое содержание хитина клеточной стенки *Trichoderma*, поэтому продукция хитинолитических ферментов была отнесена к морфогенетической роли (Lorito, 1998).

2.1.5.3. Другие гидролазы *Trichoderma*

Из мицелия микопаразитических грибов *T. harzianum* выделен новый конститутивный белок, продукт гена *cob4*, содержащий последовательность, идентичную структурным белкам многих видов грибов и термоиндуцибельному дрожжевому белку. Northern-блот анализ показал, что экспрессия гена *cob4* осуществляется в среде, содержащей глюкозу или клеточные стенки фитопатогенных грибов (Benitez et al., 1998).

Антагонистические штаммы *T. harzianum* и *T. atroviride*, выделенные из почвы в Германии, секретировали в среду роста лакказы. Авторы наблюдали корреляцию секреции фермента и образования зеленого пигмента в конидиальных спорах (Holker et al., 2002). Лакказа – медьсодержащий экзофермент, катализирующий окисление полифенолов, полиаминов, некоторых неорганических ионов с сопутствующим восстановлением кислорода до воды. При совместном культивировании *Trichoderma sp.* (штамма-продуцента фермента) с *Bacillus megaterium* показано снижение лакказной активности, а с *Penicillium sp.* – ее увеличение по сравнению с контролем (Никонов, 2006).

Помимо создания трансгенных штаммов *T. harzianum*, секретирующих повышенные количества ферментов, необходимых для микопаразитизма на фитопатогенах, остается заманчивой идея выделения молекулярных маркеров микопаразитизма. Так, в результате роста *T. harzianum* на клеточных стенках *Rhizoctonia solani* в клетках мицелия гриба выявлена индукция генов *indal* и *indc11* (Vasseur et al., 1995). Продукты генов – белок с молекулярной массой 62 kDa, гомологичный пермеазам, и белок с молекулярной массой 37 kDa, по мнению авторов, можно считать маркерами микопаразитизма.

По данным Рей с соавторами (Rey et al., 2001) изоляты *T. harzianum*, гидролизующие пестулан (полимер β -1,6-глюкана) и выделяющие желтый пигмент (β -пирон), паразитировали на спорулирующей *Rhizoctonia solani* и защищали эффективнее других биоконтрольных штаммов виноград от *Botrytis cinerea*.

Одним из важных свойств спор антагониста является гидрофобность, которая определяет способность колонизовать различные биотопы: как почвы, строительные материалы, так и растения и мицелий фитопатогенов. Гидрофобность спор определяет семейство белков гидрофобин. Наблюдалась корреляция экспрессии гена *srh1*, кодирующего гидрофобин *T. harzianum*, и споруляции (Munoz et al., 1997; Kildeso et al., 2003).

В митохондриях *T. harzianum* обнаружена кольцевая плазида Thr1 (2,6 kb). Показано, что плазида не содержала сиквенсов, гомологичных митохондриальному геному. Размер линейной плазмиды составил 1818 пн. Сиквенс-анализ плазмиды показал, что она гомологична обратной транскриптазе на кольцевых ретроплазмидах *Mauriceville* и *Varkud Neurospora spp.* и линейным FOXC2 и FOXC3 ретроплазмидам *Fusarium oxysporum*. Все плазмиды содержали консервативный блок, характерный для ретроплазмид (Antal et al., 2002).

Венгерские ученые у некоторых грибов впервые выявили липазную и эстеразную активности (Nagy et al., 2006).

2.2. Другие метаболиты *Trichoderma*

Изучение метаболизма *Trichoderma* в опытах *in vivo* и *in vitro* позволило выявить целый спектр метаболитов:

- **факторы роста**: ауксины, цитокины и этилен (Aroga, 1992; Benitez, 1998, 2004),
- **фитогормоны** типа индолил уксусной кислоты (ИУК) и этилена, цитокинин-подобные молекулы, например, зеатин и гибберилин или связанный гибберилин (Osiewacz, 1992; Benitez, 2004),
- **органические кислоты** типа глюконовой, лимонной или фумаровой кислот. Эти органические кислоты образуются при метаболизме углеродсодержащих соединений, главным образом, глюкозы (Gomez 1997; Benitez, 2004),
- **внутриклеточные аминокислоты**: серин, лизин, гистидин, теонин, тирозин, валин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, аргинин, аспарагин, изовалин и другие (Stoppacher et al., 2006),

- **витамины:** тиамин, биотин, пиридоксин, инозит и другие.

- **Антибиотики:**

Известно свыше 100 антибиотиков, которые продуцируют грибы рода *Trichoderma* и проявляют противомикробную активность (Harman, 2004). Среди этих метаболитов выявлены харзиановые кислоты, аламетицины, трихолин, пептаиболы, антибиотики, 6-пентил- α -пирон, виридин, глиовирин, глизопренины, гептелидовая кислота, дикетопиперазины, сесквитерпены, стероиды и другие.

алкилпироны: 6-пентил-пирон (Reithner et al., 2006), придает запах кокоса культуре *T. viride*, алкил-6-дельта лактоны (Stoppacher et al., 2006),

изонитрилы: изонитрин А-D и изонитриловые кислоты Е и F были выделены из культур *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. polysporum* и *T. viride*, *T. longibrachiatum*,

поликетиды харзианолид, который был выделен из культуры *T. harzianum*, *T. koningii*, октакетидкетодиол-6 (*T. koningii*) (Gutierrez et al., 2006),

пептаиболы – класс линейных пептидов. В биосинтезе антибиотиков пептидной природы участвуют «не рибосомные пептид-синтазы» (Vizcaíno et al., 2005; Gutierrez et al., 2006). Выделена пептаибол-синтаза из *T. virens*, установлен и клонирован соответствующий ген (Benitez et al., 2004; Stoppacher et al., 2006),

трихополины А и В – пептидные антибиотики, выделенные из культуры *T. polysporum*. Экстракция изолятов *T. koningii*, селекция которых проводилась по активности против других грибов, позволила выделить пептаибол триконингин КAV (19 остатков аминокислот) и два липопептаибола по 11 аминокислотных остатков каждый, триконингины КVI и КVII. Трихорзианины, выделенные из *T. harzianum*, были определены как пептиды, состоящие из 19 аминокислотных остатков, во фракции которых содержится большое количество α -аминоизомасляной кислоты. Трихорзианин А ингибировал радиальный рост штамма *T. harzianum*, из которого были выделены испытуемые антибиотики,

дикетопиперазины – антибиотики глиотоксин – (**Q тип** – *Trichoderma*) и глиовирин – очень близкое соединение к глиотоксину (**P – тип** *Trichoderma*).

Антибиотик глиотоксин был выделен впервые Вейндингом и Эмирсоном, назван глиотоксином в 1941 году, а в 1945 году охарактеризован (Howell, 1998). Структура глиотоксина была определена много лет спустя, продуцент был идентифицирован как *G. virens* в 1964 году, а затем уже как *T. virens*,

сесквитерпены – гептелидовая кислота является одним из вторичных метаболитов, которые служат связующим звеном между *T. virens* и другими видами рода *Trichoderma*. Данное вещество было выделено из культур *T. viride*, *T. virens* и *T. koningii*. Из культуры *T. virens* был выделен каротан - сесквитерпен SAT-603 (Stoppacher et al., 2006),

стероиды – антибиотик виридин был впервые выделен из культуры *T. viride* (тогда *G. virens*). Виридиол являлся конечным продуктом биосинтеза, в котором предшественником был виридин (Pardovitz-Kedmi et al., 2006). Виридиол образуется на субстратах с низким содержанием азота,

из *T. longibrachiatum* Rifai agg. выделены производные тетрановой кислоты: 5-гидроксивертинолид и бислогикинолид (Andrade et al., 2003).

Показано, что *T. reesei* продуцирует белок сволленин (Saloheimo et al., 2002).

Газообразные метаболиты: CO₂, O₂, C₂H₄ (Bello et al., 1997).

Глава 3. Влияние метаболитов *Trichoderma* на биоту

3.1. Виды *Trichoderma* как агенты биоконтроля фитопатогенных микроорганизмов

Сокращения:

ДОН	дезоксиниваленол;
СПР	системная приобретенная резистентность;
РСРР	ризобактериальная системная резистентность растений;
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография;
ВСА	агенты биоконтроля;
rDNA	рибосомальная дезоксинуклеиновая кислота;
АС	ацетолактатсинтаза;
ВСА	агенты биоконтроля.

Грибы рода *Trichoderma* способны подавлять жизнедеятельность фитопатогенных грибов, поэтому широко используются как коммерческие агенты для контроля возбудителей заболеваний растений (Harman, Bjorkman, 1998; Vinale et al., 2006; Steward et al., 2006; Obregon et al., 2006).

Биологическое регулирование численности фитопатогенов с помощью *Trichoderma* может происходить косвенно: а) в результате конкуренции за питательные вещества и пространство; б) в результате способности ВСА синтезировать и/или сопротивляться метаболитам, которые препятствуют прорастанию спор фитопатогена (фунгистазис); г) способности к уничтожению клетки фитопатогена (антибиоз); д) способности модифицировать ризосферу – закисляя почву так, что болезнетворные микроорганизмы не могут расти (Howell, 2003; Benitez et al., 2004; Harman, 2002; Darmono, 2006).

Показано, что выделенная из дерново-подзолистой почвы Нижегородской области *Trichoderma lignorum* (приведено устаревшее название вида, вероятно, имелась в виду *Trichoderma asperellum*), обладает средней фунгицидной активностью по отношению к возбудителям корневых гнилей растений – *Fusarium culmorum* и *F. avenaceum*, и узким спектром антибактериальных свойств (Штырлина, Штырлин, 2006). *Trichoderma asperellum* из почв Центральной Сибири также снижала пораженность растений *Fusarium spp.* (Sadykova et al., 2006).

Биологический контроль численности вида может также следовать из прямого взаимодействия между фитопатогенным микроорганизмом и ВСА как в микопаразитизме, который вовлекает физический контакт и синтез гидролитических ферментов, так и за счет токсичных соединений и/или антибиотиков, которые действуют синергически с ферментами (Gutierrez et al., 2006).

Механизм отрицательного типа взаимодействия *Trichoderma* с фитопатогенными микроорганизмами недостаточно изучен на генетическом уровне. Ли и Янгом (Liu, Yang, 2005) были предприняты попытки к созданию базы данных экспрессируемых генов для описания механизма биоконтроля на молекулярно-генетическом уровне. Для этого изучались последовательности гена *tag* в EST для *Trichoderma harzianum*. Частичное секвенирование анонимных клонов кДНК является широко используемым методом идентификации гена. Была создана специальная библиотека кДНК на основе анализа ДНК, выделенной из мицелия *Trichoderma harzianum* из 3298 случайных клонов. Последовательности были секвенированы и сопоставлены с последовательностями в EST. Выявлена гомология у 2174 клонов с известными генами

и у 451 клона с известными в EST, тогда как 673 клона представляли новые генные последовательности. Анализ идентифицированных клонов показал, что они гомологичны многим ферментам, структурным белкам и регуляторным факторам. Значительная часть генов из мицелия участвовала в процессах, связанных с микопаразитизмом и синтезом фунгицидов, которые должны были присутствовать в *Trichoderma* для проявления биоконтрольных свойств. Таким образом полученные Ли и Янгом (Liu, Yang, 2005) результаты представляют успешное применение анализа EST для изучения экспрессии генов в мицелии *Trichoderma* на примере *T. harzianum*.

В последнее время появилось много свидетельств в пользу того, что биоконтроль является результатом различных клеточных процессов, а не только ферментативного гидролиза, как предполагалось ранее. Исследования подтверждают, что, по крайней мере, один комплекс ферментов – хитиназ – играет одну из главных ролей в отрицательных взаимодействиях *Trichoderma* с фитопатогенами (Kubicek, 2001).

Типы взаимодействия грибов рода *Trichoderma* с фитопатогенами

Микопаразитизм

Микопаразитизм – это прямая атака одного гриба другим. Это сложный процесс, который включает несколько этапов: хемотропизм, распознавание, атака, частичное проникновение в клетку хозяина и его убийство. Штаммы *Trichoderma* могут осуществлять прямой биоконтроль, паразитируя на большом количестве грибов, распознавая их и прорастая на них. Чувствительность некоторым образом связана с повышением экспрессии ферментов разрушающих клеточную стенку, главным образом, хитиназ, глюканаз и протеаз. Механизм индукции у различных штаммов *Trichoderma* различен. Считается, что грибы секретируют экзохитиназы конститутивно на низком уровне постоянно. В том случае, когда хитиназа деградирует клеточную стенку грибов, из них высвобождаются олигомеры, которые индуцируют эндохитиназы и начинается атака (Benitez et al., 2004; Shores, Harman, 2006).

В то же время остается заманчивой идея выделить молекулярные маркеры микопаразитизма. В результате роста *T. harzianum* на клеточных стенках *Rhizoctonia solani* в клетках мицелия гриба выявлена индукция генов *indal* и *indc11*. Продукты генов – белок 62 kDa, гомологичный пермеазам и белок 37 kDa – можно считать маркерами микопаразитизма.

С целью изучения механизма микопаразитизма использовали моноклональные антитела, полученные против гликопротеина терминальных хламидоспор и гифов микопаразитических *Trichoderma*. Иммуноцитохимический анализ двойной культуры *Trichoderma* и *Rhizoctonia solani* показал, что гифы гиперпаразита полностью окружали *Rhizoctonia solani* (Thornton et al., 2002).

Этапы микопаразитизма

Хемотропизм. Положительный хемотропизм представляет собой рост по направлению к химическому стимулу. Еще в 1981 году Чет с коллегами показал, что грибы *Trichoderma* определяют хозяина на расстоянии. Гифы микопаразита начинают разветвляться необычным образом, и разветвления растут по направлению к грибу-мишени. Несмотря на кажущийся рост *Trichoderma* по химическому градиенту, ни о каких других веществах, индуцирующих рост, кроме аминокислот и сахаров, не сообщается. Таким образом, до сих пор не ясно, являются ли стимулы специфичными для каждого гриба-хозяина. Принято мнение о том, что хемотропизм обеспечивает

некоторые преимущества антагонисту. Однако хемотропизм не считается существенным этапом микопаразитизма (Chet et al., 1998).

Опознавание. Во всех экспериментах с *Trichoderma* показан специфичный антагонизм по отношению к грибам-мишеням. Результаты опытов привели к идее, согласно которой молекулярное распознавание обоими партнерами друг друга представляет важный этап, предшествующий процессу антагонизма. Такое распознавание может быть физическим (тигмотропизмом) или химическим (хемотропизмом). Под хемотропизмом здесь понимают гидрофобное взаимодействие или взаимодействие между комплементарными молекулами, расположенными на поверхности клеток хозяина и паразита. Например, взаимодействие между лектинами и сахарами. Лектины являются связывающими сахара белками или гликопротеинами, которые склеивают клетки, и веществами, участвующими во взаимодействии клеточной поверхности с внеклеточными компонентами (Chet et al., 1998). Показано, что гифы *R. solani* содержат лектины, которые специфично связывали эритроциты типа О, но не связывали клетки типа А или В. Галактоза и фукоза, но не другие сахара, подавляли агглютинацию. Полученные результаты позволили предположить, что лектины *R. solani* участвуют в раннем взаимодействии с грибами *Trichoderma*, если клеточные стенки последних содержат сайты взаимодействия, такие, как фукоза и галактоза, специфичные к данным лектинам. Клеточные стенки *Trichoderma* действительно содержат галактозу. По-видимому, лектины на гифах *R. solani* способны распознавать остатки галактозы на клеточных стенках *Trichoderma*, что позволяет хищнику опознавать жертву. В дальнейшем Барак с соавторами изучал роль лектинов во взаимодействии *Trichoderma-R. solani*, заменив эритроциты в тесте агглютинации бактериальными клетками. Авторы сравнивали воздействие различных сахаров на оплетание гифами *R. solani* клеток *E. coli* и взаимодействие между грибами. Авторы обнаружили, что метил-L-фукозил – ингибитор агглютинина *R. solani* – предотвращал накручивание гифов *Trichoderma* вокруг гифов *R. solani*. Авторы также установили, что клеточные стенки *Trichoderma* содержали остатки L-фукозы, которые, возможно, служили рецепторами агглютинина *R. solani*. Авторы предположили, что распознавание является самым ранним этапом взаимодействия между грибами, впоследствии приводящим к микопаразитизму. Жизнеспособность взаимодействующих грибов в течение процесса микопаразитизма изучали с помощью диацетата флюоресцеина (ДФ). Краситель проникает в клетки как бесцветное вещество и под действием клеточных ферментов превращается в флюоресцеин. Авторы сравнили жизнеспособность грибов *Trichoderma* и *R. solani*, растущих отдельно, и во время взаимодействия друг с другом. Авторы, обнаружили, что атакованные гифы *R. solani* погибали быстрее, чем не атакованный мицелий. С другой стороны, паразитирующие гифы *Trichoderma* сохраняли жизнеспособность в течение более длительного времени, чем непаразитирующие, возможно, в результате повышения количества питательных веществ, благодаря паразитизму. Проведенное исследование показало, что при первоначальной атаке *T. hamatum* грибов *R. solani* хозяин все еще жизнеспособен. Снижение жизнеспособности и повреждения гриба-хозяина развиваются через 24 ч после атаки.

Барак с соавторами обнаружили, что важный фитопатоген *Sclerotium rolfsii* продуцирует лектин, ассоциированный с внеклеточными полисахаридами. Агглютинирующая активность этого лектина специфично подавлялась D-глюкозой и D-маннозой. Авторы сообщали о том, что способность различных изолятов видов *Trichoderma* атаковать *Sclerotium rolfsii* зависит от агглютинации конидий *Trichoderma*

с агглютинином *S. rolfii*. Агглютинин обеспечивал специфическое распознавание патогена различными изолятами *Trichoderma*. Барак и Чет (Chet et al., 1998) выделили лектин и обнаружили, что данное вещество связано с β -1,3-глюканами клеточной стенки патогена. По данным SDS-электрофореза выделенный лектин состоял из двух субъединиц размером 55 и 60 kDa. С помощью специфичных антител, полученных против лектина, авторам удалось показать, что лектин расположен в определенных сайтах по всем гифам *Sclerotium rolfii*. Авторы показали, что лектин адсорбировал только конидии *T. hamatum* T-244, антагониста *S. rolfii*, но не других антагонистических штаммов *Trichoderma*, что свидетельствовало о том, что именно лектин определял специфичность паразитического взаимодействия.

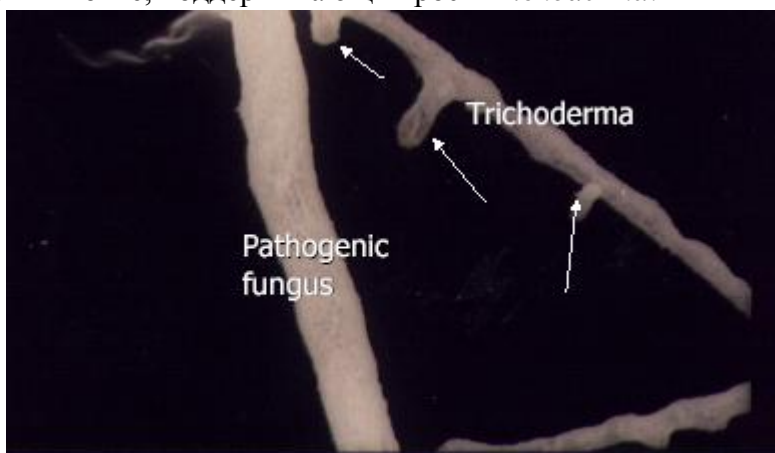
Второй лектин из *S. rolfii* был выделен Инбар и Чет в 1994 году (цит. по Chet et al., 1998). Молекулярный вес выделенного лектина составил 45 kDa. Агглютинирующая активность лектина не подавлялась ни одним из тестируемых моно- и дисахаров, но ингибировалась гликопротеинами – муцином и азиаломуцином. Протеазы, так же, как β -1,3-глюканазы, полностью подавляли агглютинацию, что свидетельствовало об обязательном участии обоих гликопротеинов и β -1,3-глюканов в процессе агглютинации. Авторы разработали биомиметическую систему, в которой нейлоновые нити выполняли роль гифов патогена. Система, основанная на ковалентном связывании лектинов на поверхности нейлоновых нитей, позволяла оценить роль лектинов в микопаразитизме. Очищенный лектин, связанный с поверхностью нейлоновых нитей, индуцировал микопаразитическое поведение *T. harzianum*, в отличие от нитей, не содержащих лектины. Полученные данные непосредственно свидетельствовали об участии лектинов в микопаразитизме. Распознавание гриба-хозяина и прикрепление микопаразитических грибов *Trichoderma* к клеточной поверхности *Sclerotium rolfii* определяется сложным агглютинирующим полимером по всей поверхности гифов хозяина. Это распознавание инициирует различные процессы в клетках *Trichoderma*, которые приводят к формированию инфекционных структур и процессов, приводящих к разрушению хозяина.

Гомес с соавторами (Gomes et al., 1997) изучали взаимодействие *Trichoderma-Trichoderma*. Авторы разделили изоляты *Trichoderma* на основании RAPD анализа и электрофореза кариотипов, что поставило интересный вопрос: будут ли представители одной группы определять друг друга одинаковым образом и будут ли они формировать похожие вегетативные формы, способные к анастомозису? В конфронтационных тестах показано, что представители одной группы взаимодействовали друг с другом одинаковым образом, что приводило к растворению гифов, но никогда не приводило к гибели гриба. Напротив, взаимодействие представителей разных групп приводило к коллапсу клеточных мембран и гибели клеток, что свидетельствовало об антагонизме. Полученные данные свидетельствовали о важности этапа распознавания при взаимодействии *Trichoderma-Trichoderma* (Chet et al., 1998).

Прикрепление и обвивание мицелия гриба-хозяина. После распознавания гифы *Trichoderma* прикрепляются к гифам хозяина, формируя структуры для захвата, и структуры, похожие на аппрессории. Далее гифы паразита окружают гифы хозяина (Benitez et al., 2004). Аппрессориоподобные структуры служат для проникновения в клетку хозяина, так как содержат высокие дозы осмотических растворов, таких как глицерин (Reithner et al., 2005). Пример, в опытах *in vivo* методом встречных культур, демонстрирующий этот феномен, приведен на фото 3.1 и 3.2, на котором гифы микопаразита обвивают гифы *R. solani* (Chet et al., 1998). Установлено, что конидии *T. harzianum* прорастают в стерильной почве, формируют мицелий, который растет в

почве по направлению к мицелию хозяина. Когда грибы контактировали, гифы паразита окружали гифы хозяина и формировали типичные аппрессории. Интенсивность паразитических отношений в почве была ниже, чем в тесте конфронтации двух культур, возможно, из-за более низкой концентрации питательных веществ в почве, поддерживающих рост *Trichoderma*.

А



Б



Фото 3.1. Микопаразитическое взаимодействие. Сканирующая электронная микрофотография гиф *Trichoderma*, окружающих гифы *Rhizoctonia solani*. Хемотропизм (А), опознание и обвивание (Б) (фото адаптировано из статьи Elad et al., 1983).

Типичное прикрепление и окружение представляют собой последние события непосредственно перед действием литических ферментов.

Trichoderma прикрепляется к патогену с помощью механизма взаимодействия углеводов собственной клеточной стенки с лектинами стенок патогена. Как только *Trichoderma* прикрепляется к патогену, она обвивается вокруг мицелия, и формируется аппрессория. На следующем этапе выделяются пептаболы и ферменты, что усиливает способность гиф *Trichoderma* проникать в цитоплазму паразитических грибов (Gutierrez et al., 2006). Исследования сигнальных путей *T. atroviride* в течении микопаразитизма привели к выделению ключевых компонентов, таких, как сАМР и МАР-киназы, α -субъединицы G-белков, контролирующих внеклеточные ферменты, выделение антибиотиков и окружение гиф хозяина (Pardovitz-Kedmi et al., 2006). G- α белок участвует в окружении гиф хозяина, так как наблюдалось усиление обвивания

нейлоновых нитей после добавления в среду мастопарана и флюоролюминоата. Экспрессия гена G- α (*tga1*) находится под контролем собственного промотера или под контролем промотера щелочной протеиназы *prb1* в случае *T. atroviride*. Оба типа трансформанта обнаружили увеличенное обвивание, более того, высокие экспрессии гена *tga1* у *T. viride* так же приводили к усилению прорастания на *Rhizoctonia* (Reithner et al., 2005; 2006; Brunner et al., 2006).

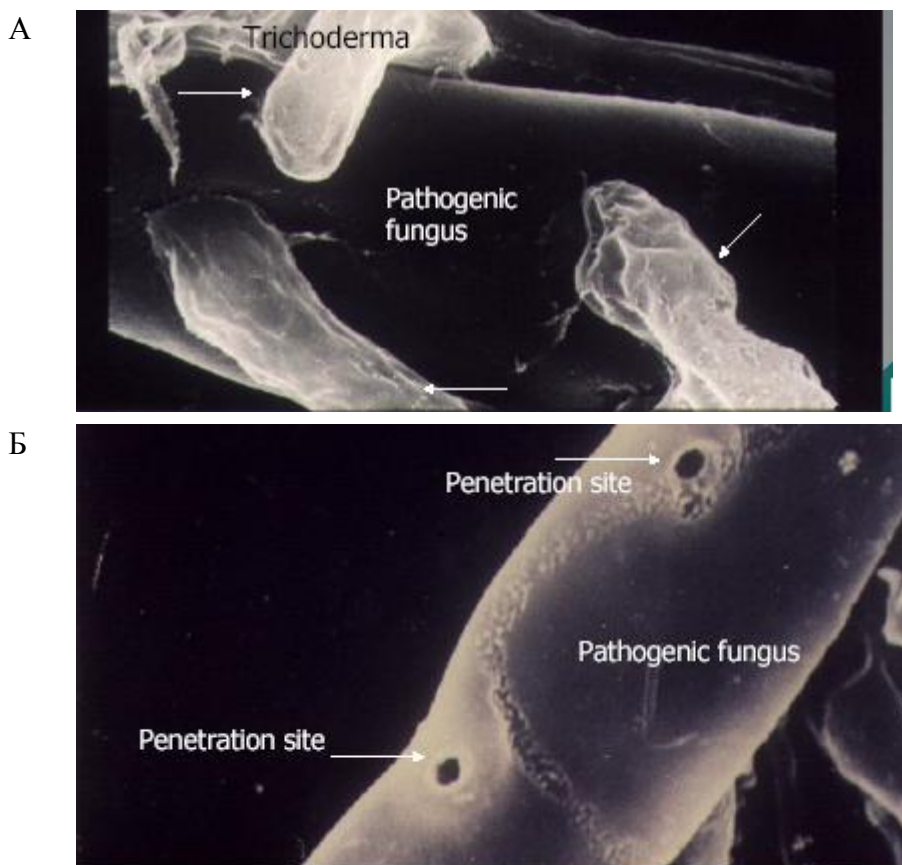


Фото 3.2. Микопаразитическое взаимодействие. Сканирующая электронная микрофотография гиф *Trichoderma*, окружающих гифы *Rhizoctonia solani*. Образование гаусторий у тонкого мицелия *Trichoderma* для прикрепления к более широкому по диаметру мицелию *R. solani* (А), разрушение мицелия гриба хозяина под действием литических ферментов *Trichoderma* (Б) (фото адаптировано из статьи Elad et al., 1983).

В другой работе наблюдали прикрепление антагонистических дрожжей *Pichia guilliermondii* к фитопатогену *Botrytis cinerea*. Прикрепление подавляли агенты, изменяющие целостность белков на поверхности клеток (соли, протеазы), так же как и некоторые сахара. Авторы считали, что у биоконтрольных дрожжей прикрепление ассоциировано с секрецией ферментов, деградирующих клеточные стенки хозяина.

Изучение последовательного взаимодействия гиф *T. koningii* и *Ustilago segetum tritici* показало, что после контакта антагониста с хозяином появлялись инфекционные шипы со слегка расширенной вершиной. Под влиянием антагониста происходил лизис мицелия патогена.

Ультраструктурные изменения и клеточные механизмы микопаразитизма

Выявлены цитологические и ультраструктурные изменения хозяина в ответ на атаку антагониста (Chet et al., 1998). Первые ультраструктурные изменения контакта между организмами *Botrytis cinerea* и *Trichoderma* характеризовались точечными

инвагинациями плазмолеммы первого. Далее следовало втягивание плазмолеммы у фитопатогена, дезорганизация цитоплазмы, потеря тургорного давления и гибель клетки. При контакте гиф *Trichoderma* с гифами хозяина происходит деградация хитина клеточной стенки фитопатогена. Антагонизм определяется в первую очередь антибиозом, приводящим к гибели клетки, с последующей деградацией ее под действием хитинолитических ферментов.

При исследовании антогонистической активности *T. harzianum* в отношении *Sclerotinia sclerotiorum*, *minor*, *S. rolfsii* было обнаружено, что антогонист непосредственно паразитирует на гифах патогена. Гифы *T. harzianum* проникали между клетками коры склеротия внутрь них, вызывая разрушение клеток.

Чет (Chet et al., 1998) сообщил о том, что процесс опознания при контакте между *T. harzianum* и *R. Solani* сразу сопровождается основными изменениями в клетках хозяина, такими, как деградация клеточных стенок, разрушение плазмалеммы и агрегация цитоплазмы (фото 3.3). С помощью сканирующей электронной микроскопии зоны взаимодействия между грибами показано, что повреждение гиф *R. solani* возникает сразу после окружения их гифами *T. harzianum*. Данное наблюдение подтвердило мнение о том, что результат взаимодействия определяется в значительной степени начальными событиями при контакте, которые приводят к присоединению антагониста к хозяину, что в свою очередь вызывает разрушение патогена. Более точные исследования, выполненные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, показали, что клетки *Trichoderma* непосредственно контактируют с мицелием хозяина через тонкий волокнистый матрикс, образованный гифами *R. solani*. Полисахаридная природа этого матрикса была доказана при помощи галактоза специфичного лектина, агглютинина *Ricinus communis* (RcA).

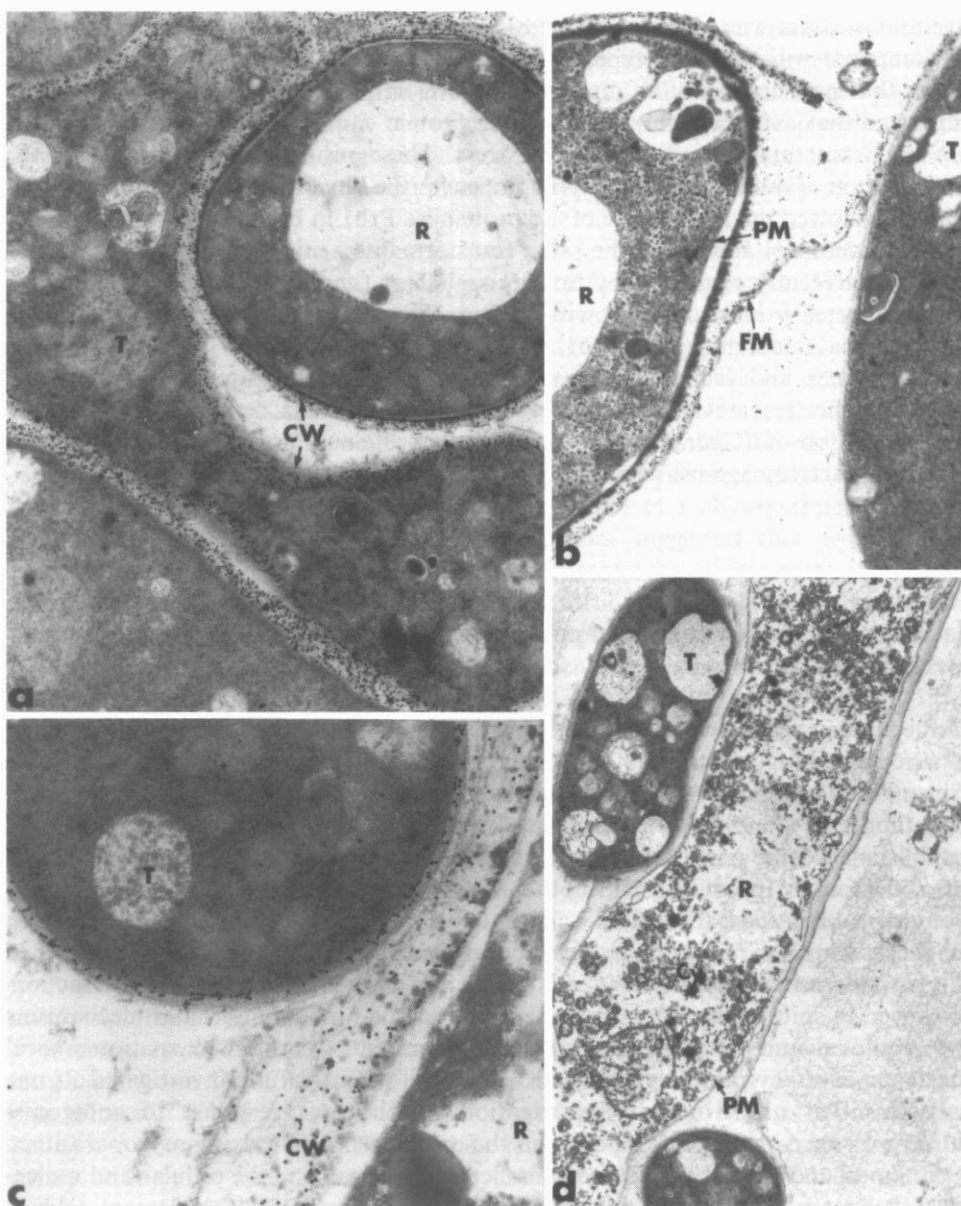


Фото 3.3. Трансмиссионные электронные микрофотографии двойной культуры *T. harzianum* (T) и *R. solani* (R). (a) Через 2 дня после инокуляции. Гифы *T. harzianum* прикрепляются к клеточной стенке *R. solani*. Клеточные стенки (CW) обоих грибов окрашены комплексом овомукоид-золото, агрегирующим на хитине (X 15000). (b) Через 4 дня после посева. Ранняя деградация гифов *R. solani*, локальное растворение плазматической мембраны (PM). Тонкий внешний волокнистый матрикс (FM), окружающий клеточную стенку *R. solani*, прилегает к клеточной стенке антагониста и отрывается от стенки *R. solani* (X 20000). (c) Через 5 дней после инокуляции. Измененная клеточная стенка *R. solani* окрашена коллоидным золотом (X 35000). (d) Успешное взаимодействие. Гифы *R. solani* разрушены, видны нарушения мембраны и деградация цитоплазмы (Cy) (X 8000) (фото адаптировано из Kubicek et al., 1998).

Роль литических ферментов *Trichoderma* в биоконтроле фитопатогенных грибов

1,3-β-глюканазы и протеазы в биоконтроле фитопатогенных грибов

Показано, что основную роль в отрицательных взаимодействиях *Trichoderma* с фитопатогенами могут играть глюканазы, протеазы, целлюлазы и другие гидролазы (Kubicek, 2001; Zembek et al., 2006; Ciliento et al., 2006; Djonovic et al., 2006a).

Хитиназная и 1,3-β-глюканазная активности выявлены при росте *T. harzianum* на среде, содержащей клеточные стенки *Sclerotinia sclerotiorum* в качестве единственного источника углерода. К тому же электрофоретические профили белков, индуцированных в *T. harzianum*, показали разницу в количестве между основными полосами, полученными на среде с клеточными стенками *Sclerotinia sclerotiorum* и на среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода (Menendez, Godeas, 1998).

Показано, что β-1,3-глюканы ингибируют прорастание спор или рост патогена путём синергичной кооперации с хитиназами и антибиотиками и подавления фитопатогенов (Mamarabadi et al., 2006). Например, клонированы гены кодирующие β-1,3-глюканы, и участвующие в биоконтроле, как ген кодирующий экзо-α-1,3-глюканазу *agn13.2* из *T. asperellum* T32, подавляющей патоген клубники *Botrytis cinerea* (Sanz et al., 2005). Показана индукция β-1,6-глюканы *T. virens* (TV-BGN3) и ингибирование роста *Phythium ultimum*, *Rhizoktonia solani* и *Sclerotinia minor* (Djonovic et al., 2006a).

Сконструирован штамм *T. harzianum* с высокой экспрессией гена β-1,3-глюканазы *bgn13.1*. Установлено, что трансформанты с высокой экспрессией *bgn13.1* ингибируют рост *B. cinerea*, *R. solani* и *Phytophthora citrophthora*. Трансформант T28 с самым высоким уровнем активности глюканазы гена β-1,3-глюканазы *bgn13.1* как в условиях репрессии, так и в условиях индукции ингибировал патогены в большей степени. В среде с целлюлазой и глюканом антагонизм увеличивается против *P. citrophthora*, *Botrytis* и *Rhizoctonia*, в клеточных стенках которых главными компонентами являются хитин и глюкан. Кроме того, β-1,6-глюканы были получены из штамма 2413. Глюканаза *bgm16.2* обладала высокой антигрибковой активностью, сама по себе или в комбинации с хитиназами и снижала рост *B. cinerea* и *Gibberella fujikuroi*. Трансформанты, продуцирующие *bgm16.2*, контролируют рост *B. cinerea* и *R. solani*. Целлюлазы (β-1,4-глюканы), включающие целлобиогидролазы, эндоглюканы (*egl1* и *egl2*), β-глюкозидазы, также могут участвовать в биоконтроле. Мигель с соавторами получил трансформанты с более высокой биоконтрольной активностью, чем у дикого типа, против *P. ultimum* на проростках огурца. *T. harzianum* T3 продуцирует различные целлюлазы, что делает изолят очень эффективным в контроле *P. ultimum*. Другие гидролазы, такие как α-1,3-глюканы, получены из штамма 2413, выделены гены, высокая экспрессия которых приводила к высокой биоактивности трансгенных штаммов (Miguel et al., 2005).

Для борьбы с болезнью какао предлагается трансгенный штамм *T. harzianum*, являющийся суперпродуцентом протеазы. Данный фермент является важной частью атакующего комплекса, гидролизующего клеточные стенки *Cripinellis pernicioso*. Авторы предлагают создавать трансгенные штаммы *T. harzianum*, секретирующие повышенные количества хитиназ, липаз, гликозидаз и протеаз.

Биоконтроль *B. cinerea* штаммом *T. harzianum* осуществляется так же с помощью протеаз, которые инактивируют гидролитические ферменты патогена, выделяемые им при инфицировании листьев бобовых растений. Например, показано, что щелочная протеаза *Prb1* из *T. harzianum* играет важную роль в биоконтроле. Трансформанты по гену *prb1* обладают высокой (в 5 раз) биоконтрольной активностью против *R. solani*. Ген, кодирующий внеклеточную сериновую протеазу (*tvsp1*), выделен из *T. virens* и клонирован (Pozo et al., 2004). Высокая экспрессия этого гена позволила увеличить защиту проростков хлопчатника против *R. solani*. Показано, что этот ген можно эффективно использовать для улучшения биоконтрольной способности, так как сериновые протеазы эффективны против оомицетов и нематод. Сериновые протеазы

(28 kDa) с трипсиновой активностью, выделенные из штамма 2413, так же снижают вылупление из яиц корневых нематод. Янгом с соавторами выделена сериновая протеаза из *Gliocladium roseum*, разрушающая кутикулу нематод (Yang et al., 2006).

Протеаза обладает синергичным эффектом с другими белками, образование которых происходит во время антагонистической активности этого штамма. Антал с соавторами (Antal et al., 2000) провел скрининг психрофильных штаммов и обнаружил, что большинство штаммов, продуцирующих хитиназы, β -гликозидазы и трипсиноподобные, химотрипсиноподобные протеазы, активны при низких температурах. Роль протеаз в микопаразитизме привлекла внимание в результате выделения новых штаммов *T. harzianum* с высокой экспрессией протеаз. Мутанты с большим количеством секретируемых протеаз были получены путём УФ облучения. Считают, что некоторые из них являются эффективными антагонистами к фитопатогенам, таким как *F. culmorum* и *R. solani*.

Дикий штамм *T. harzianum* ингибирует рост *B. cinerea* на 30%, трансгены, экспрессирующие β -1,3-гликозидазу и хитиназу или только β -1,6-гликозидазу, ингибировали рост *B. cinerea* на 60%. Синергизм между ферментами, секретируемыми против различных фитопатогенов, исследовали с помощью комбинированных трансгенов. Комбинированные трансгены – супер-продуценты хитиназы и β -1,3-гликозидазы были более эффективны, чем индивидуальные трансгены, против *Risoctonia meloni*. Отмечают также штаммоспецифичность у антагониста к фитопатогену.

Силиенто с соавторами (Ciliento et al., 2006) использовала индуцибельные промотеры в репортерной системе, основанной на гене глюкозооксидазы *Aspergillus niger* (*gox*), для увеличения биоконтрольной активности *T. harzianum* T22.

Роль хитиназ в биоконтроле

Антигрибная активность бактериальных и растительных хитиназ известна в течение долгого времени. Так, например, было показано, что эндохитиназа (42 kDa), хитобиозидаза (40 kDa) и N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (73 kDa) штамма P1 *T. atroviride* и штамма 41 *T. virens* ингибировали прорастание спор и элонгацию гиф фитопатогенных грибов: *Botrytis cinerea*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Ustilago avenae*, *Uncinula necator*, а также подавляли все грибы, в клеточной стенке которых содержался хитин. По сравнению с другими хитинолитическими ферментами, эндохитиназы, обычно, являются самыми активными антигрибными и литическими агентами. Интересно, что эффективность антигрибных ферментов *Trichoderma* была выше, чем активность ферментов растений, бактерий и других грибов в аналогичных условиях, что подтверждает гипотезу о том, что ферменты *Trichoderma* приспособлены для разрушения клеточных стенок других грибов. Ферменты *Trichoderma* способны разрушать не только нежные молодые гифы, но также грубые, содержащие много хитина внешние гифы, конидии и склероции (Kubicek, 2001).

Стимуляция фунгицидного действия хитиназ в результате синергизма с другими метаболитами

Показано, что хитиназы действуют в строгом синергизме с другими ферментами хитинолитического комплекса, в том числе, с антибиотиками. Синергизм с другими хитинолитическими и глюканолитическими ферментами значительно усиливает литический и ингибиторный эффект даже в том случае, когда активность отдельных ферментов низкая. Хитиназы способны усиливать антигрибное действие веществ, не обладающих ферментативной активностью. Например, хитинолитические ферменты действуют в синергизме не только с природными веществами, но и с синтетическими мембранотропными веществами, подавляющими грибы.

Механизм синергизма фермента и антибиотика изучен детально. Показано, что совместное действие хитиназ и мембранотропных веществ или пептаибольных антибиотиков приводит к нарушению целостности клеточных стенок мишени (Soriente

et al., 2006). Пептаиболы представляют собой линейные олигопептиды из 12-22 аминокислотных остатков, к некоторым из них ковалентно присоединен β -аминоизобутрат (Gutierrez et al., 2006). N-концы пептидов ацетилированы, либо содержат аминокислоты (феол или терпол) на C-конце. Известно, что пептаиболы образуют заряженные, ионные каналы в липидных мембранах и изменяют мембранную проницаемость лизосом. Таким образом, пока хитиназы понижают ригидность клеточной стенки (и нарушают ее барьерные функции), пептаибольные антибиотики ингибируют мембранно-связанные ферменты, подавляя, таким образом, способность гриба восстанавливать повреждения, нанесенные хитиназами.

Эта модель подтверждается данными об изменении проницаемости мембран гриба мишени вследствие микопаразитизма *Trichoderma*. Однако это не единственное объяснение синергизма с антибиотиками. Существуют данные о синергизме с g-пентилпиринами *in vivo* (Howell, 1998; Lorito, 1998).

Экспрессия гена хитиназы *Trichoderma* в случае биоконтроля

В опытах *in vitro*, во встречаемых культурах, проводимых в чашках Петри, при микопаразитизме *T. harzianum* на различных грибах-мишенях наблюдается накопление различных хитиназ, особенно N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (73 kDa) и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (102 kDa) и эндохитиназы (42 kDa). Синтез этих ферментов определялся видом гриба - хозяина (Kubicek, 2001).

Показано, что образование хитиназ у *T. harzianum* усиливается в результате лектин-зависимого физиологического взаимодействия с грибом хозяином. Это взаимодействие признано первичным и, возможно, зависит от присутствия в среде хитоолигомеров. Подтверждением этой гипотезы являются эксперименты, в которых нейлоновые нити, покрытые лектином *Sclerotinia sclerotiorum*, прекрасно заменяли присутствие хозяина. В следующем опыте показано, что только хитиназа-102kDa индуцируется в присутствии лектина, а синтез других хитиназ происходит только в присутствии живого хозяина. Авторы сделали вывод о том, что хитиназа-102kDa отвечает за первую атаку и обеспечивает индукцию других хитиназ. Однако индукционный каскад является гораздо более сложным.

Исследована экспрессия генов *ech42* и *nag1* во время микопаразитизма *T. atroviride* на *R. solani* *in vivo* с помощью зеленого флуоресцентного белка *Aequorea victoria* (GFP) в условиях, которые не вызывают разрушения клетки. Показано, что в результате первичного контакта микопаразита и хозяина индуцируется экспрессия гена *ech42*, но не *nag1*. Похожие исследования с GFP были проведены с геном *chit33* *T. harzianum* (Dana et al., 2000), которые показали, что первичный контакт с хозяином не приводит к индукции *chit33*. По-видимому, индукция в результате контакта характерна только для гена *ech42*. Интересно, что экспрессию гена *ech42* можно предотвратить, поместив диализную мембрану между паразитом и хозяином. Целлофановая мембрана же не предотвращает экспрессию. Это наводит на мысль о размере молекул, являющихся триггером экспрессии гена *ech42*. Следует отметить, что целлофан, в отличие от диализной мембраны, проницаем для небольших белков (не более 100 kDa) (Kullnig et al., 2000). Так, два независимых исследования показали, что индукция гена *ech42* происходит до контакта с хозяином, и, возможно, представляет собой самое раннее событие микопаразитизма и биоконтроля.

Природа молекул, выделяемых хозяином, индуцирующих биоконтрольные гены

Доступность мутантов, в которых можно выявлять экспрессию биоконтрольных генов при помощи экспрессии гена GFP или некоторых секретлируемых ферментов, значительно облегчила молекулярные исследования механизмов, которые приводят к

активации антагонистических свойств биоконтрольных штаммов *Trichoderma*. Подобные методы позволяют идентифицировать выделяемые хозяином молекулы, индуцирующие каскадную экспрессию биоконтрольных генов (Mach et al., 1999). Установлено, что растворение клеточных стенок хозяина смесью предварительно очищенных хитиназ и глюканаз (как эндо-, так и экзо-) *Trichoderma* приводило к высвобождению продуктов, которые являлись мощными элиситорами экспрессии генов *ech42* и *nag1* и последующего микопаразитизма. Интересно, что различные комбинации позволяли повреждать разные патогены, по-видимому, высокая активность хитинолитических ферментов *Trichoderma* обеспечивает им способность поражать широкий круг грибов. С помощью ВЭЖХ и масс спектрометрии удалось выделить и очистить низкомолекулярные вещества из клеточных стенок хозяина. Эти вещества являлись более мощными индукторами *in vitro*, чем мономеры или олигомеры хитина или глюкана.

Очевидно, что применение веществ из клеточных стенок хозяина для активации биоконтроля/микопаразитизма очень важно для сельского хозяйства, (т.к. применение этих веществ приведет к повышению биоконтрольных свойств природных штаммов и сделает лишним применение других препаратов). Элиситоры также могут применяться для коммерческого получения ферментов *Trichoderma* (если они сократят время производства и повысят эффективность препарата).

Использование методов генетической инженерии для получения эффективных биоконтрольных штаммов *Trichoderma*

Очевидная высокая антигрибная активность хитиназ *Trichoderma* приводит к попыткам улучшить или изменить биоконтрольные свойства штаммов путем генетических манипуляций. Биоконтрольная активность мутантного штамма IMI 206040 *T. atroviride*, не образующего продукт гена *ech42*, не отличается от активности родительского штамма в теплице против *Sclerotium rolfsii* и *R. solani* на хлопчатнике. Авторы сделали вывод о том, что продукт гена *ech42* не важен для биоконтроля. Напротив, другие исследователи (Woo et al., 1999), изучавшие роль гена *ech42* у *T. atroviride* и *T. viride*, показали, что состояние этого гена определяло активность биоконтроля. Так, штаммы с двумя копиями гена были активнее штаммов с одной копией и штаммов с нарушенным геном. Показано, что штаммы с нарушенным геном не подавляли прорастание спор *B. cynerea* и элонгацию гиф фитопатогена. Однако ингибиторная активность восстанавливалась при добавлении 10 мкг эндохитиназы-42 kDa в культуральную жидкость. Интересно отметить, что не было очевидной разницы между дефицитным и родительским штаммами в их способности нарастать на мицелий *B. cynerea* и *R. solani* на агаре в тесте на антагонизм. Однако *in vivo* на листьях бобов, зараженных *B. cynerea*, штамм, дефицитный по гену *ech42*, обладал явно сниженной биоконтрольной активностью. В то же время в почвах, сильно инфицированных *R. solani*, биоконтрольная активность дефицитного штамма возросла. Макроскопические и микроскопические анализы обрастания семян биоконтрольными штаммами *T. atroviride*, убеждают в том, что отсутствие эндохитиназы-42 kDa может привести к стимуляции колонизации семян и ризосферы. Эти опыты показали, что биоконтрольную активность можно регулировать как в положительном, так и в негативном направлении путем манипуляции с геном *ech42*. В данное время конструируются штаммы *T. atroviride* с различным набором генов хитиназ, чтобы выяснить, как они влияют на биоконтроль.

Для оценки влияния генов хитиназ *Trichoderma* на биоконтроль, кроме *ech42*, испытывали также ген *chit33* *T. harzianum* (Lemon et al., 1999). С помощью слияния протопластов, конститутивно экспрессирующих *pki1* и *chit33*, получили рекомбинантные штаммы, обладающие высокой антагонистической активностью против *R. solani* в чашках Петри.

Кроме всего, гены хитиназ *Trichoderma* могут быть использованы для усиления защитных механизмов растений. С этой целью ген *ech42* *T. atroviride* перенесен в растения табака и картофеля (Lorito, 1998). Трансгенные растения приобрели почти полную резистентность к *R. solani*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *B. cynerea* по сравнению с растениями, содержащими бактериальные или растительные гены хитиназ. Эта стратегия была подтверждена другими результатами (Bolar et al., 2000) и используется во многих лабораториях для улучшения свойств табака, картофеля, капусты, брокколи, яблонь, томатов, виноградной лозы, лимонного дерева, пшеницы, риса, лесных деревьев и других растений.

CIS- и TRANS- действующие факторы, обеспечивающие экспрессию биоконтрольных генов

Несмотря на успехи, описанные выше, возможности манипулирования с генами хитиназ по простой схеме – амплификация/выключение – могут быть ограничены из-за действия cis/trans элементов, определяющих регуляцию генов.

Вначале был использован фитопатоген *B. cynerea* в качестве модели хозяина при изучении антагонизма против штамма P1 *T. atroviride*. Комплексы из непаразитирующего мицелия содержали связанные Cre1 на обоих фрагментах промотора *ech42*. Полученные данные подтверждали тот факт, что промотор имеет два или три сайта связывания Cre1. Напротив, ДНК-белок комплексы из паразитирующего мицелия не содержали Cre1, и восстановление сайта связывания фактора было безуспешным при добавлении олигонуклеотидов. Добавление небольшого количества экстракта непаразитирующего мицелия приводило к изменению паразитирующего комплекса ДНК-белок в не паразитирующий. Добавление сшитого комплекса Cre1-глутатион-S-трансфераза приводило к такому же эффекту. Полученные данные позволили предложить предварительную модель регуляции экспрессии гена *ech42* у *Trichoderma*, согласно которой:

связывание Cre1 на двух простых сайтах на промоторе гена *ech42*;

связывание «микопаразитического» белок/белок комплекса с промотором рядом с сайтами связывания Cre1;

функциональная инактивация Cre1, что позволяет образоваться «микопаразитическому» комплексу белок-ДНК (Kubicek, 2001).

Некоторые данные, обсужденные в этом обзоре, позволяют говорить о существовании индукции экспрессии *ech42* в условиях стресса, из условий которого самыми эффективными были высокое давление, этанол и низкая температура (Mach et al., 1999). Регуляция транскрипции гена *ech42* стрессом согласуется с данными о существовании 4 стрессовых элементов (AGGGG) в области промотора. С данными сайтами у *Saccharomyces cerevisiae* связываются цинковые пальцы факторов транскрипции Msn2p и Msn4p, модулирующие различные ответы на стресс, в том числе на дефицит питательных элементов и другие условия. Соответствующие AGGGG-элементы, присутствуют также на двух промоторах генов хитиназ *Trichoderma* – *nag1*, *chit33* (Mach et al., 1999; Dana et al., 2000). В настоящее время клонированы гомологи MSN2/MSN4 *T. atroviride*. Они кодируют ДНК- связанные белки, домены со структурой цинкового пальца которых гомологичны таким же доменам дрожжевых факторов, но резко отличаются по строению от других доменов (рис. 3.4). Фрагмент белка *Trichoderma*, экспрессированный в *E. coli*, связывается специфично с фрагментом AGGGG. Опыты по выключению гена *ech42* имеют своей целью выявить регуляторную роль этого гена в экспрессии других генов и в микопаразитизме *T. atroviride*.

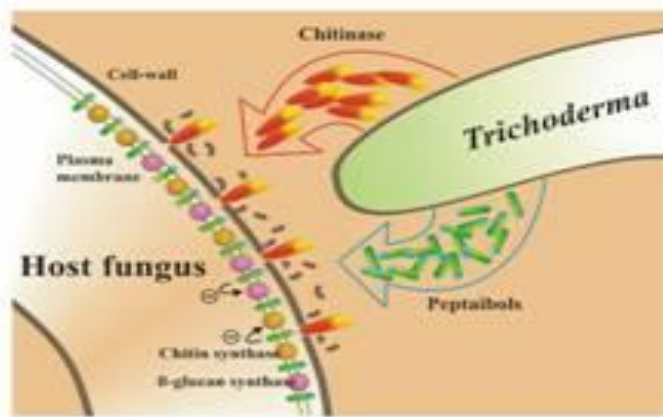


Рис. 3.4. Гипотетическая модель синергизма клеточных гидролаз с соединениями типа пептаиболов при взаимодействии к клетками хозяина (рис. адаптирован из Kubicek, 2001).

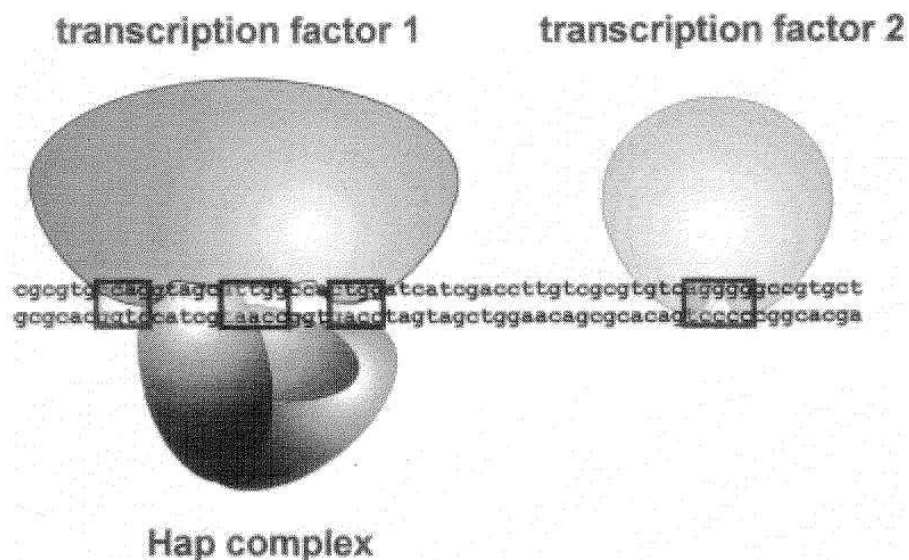


Рис. 3.5. Гипотетическая модель регуляции экспрессии гена *nag* *T. atroviride* (рис. адаптирован из Kubicek, 2001).

Кроме связанных с AGGGG белков, которые также регулируют экспрессию гена *ech42* в ответ на голодание, Кубичеком (Kubicek, 2001) идентифицирован другой элемент, который может дополнять этот регуляторный механизм. Сиквенс промотора *ech42* содержит два коротких фрагмента, которые связываются с фактором *brlA* (bristle) *Aspergillus nidulans* (5'-MRAGGGR-3'). Белок BrlA является главным регулятором развития конидий и сам по себе отвечает за голодание по углероду. Клеточные экстракты *T. atroviride*, приготовленные из мицелия, подвергнутого углеродному голоданию, образуют специфичные комплексы с олигонуклеотидными фрагментами промотора гена *ech42*, имеющими сайт связывания BrlA. Полученные данные подтверждают предварительную гипотезу об участии белка BrlA в регуляции транскрипции биоконтрольных генов.

Поскольку экспрессию гена *nag1*, кодирующего N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу-73 kDa, можно индуцировать в течение 2 ч низкомолекулярными хитоолигосахаридами (Mach et al., 1999), этот ген был использован для изучения

участия различных факторов в индукции экспрессии хитиназных генов олигомерами хитина. Используя делецию в области промотора, footprinting in vivo, метод EMSA, изучена регуляция гена *nagI* штамма P1 *T. atroviride* N-ацетил-глюкозаминном. Результаты показали, что с элементом AGGGG связывается белок на -240, с последовательностью CCAGN13CTGG на -284, и с боксом CTGG, который является спейсером предыдущей последовательности. Организация сайта на -284 сравнима с сайтом связывания белка, содержащего Zn(II)2Cys6-цинковый палец, тогда как ССААТ-бокс связывает белковый комплекс, состоящий, по крайней мере, из трех белков Nap2, Nap3, Nap5. Эти белки описаны у дрожжей, и обнаружены у плесневых грибов *A. nidulans* и у *T. reesei*. Интересно, что недавно показано, что функцией этих белков является поддержание открытой структуры хроматина (рис. 3.5).

Отрицательные взаимоотношения на основе антибиоза

Антибиотики

Долгое время считали, что антибиотики, выделяемые *Trichoderma harzianum*, также обеспечивают биоконтрольную активность этих грибов. Так из сублимированных диализатов культур *Trichoderma roseum*, выращенных на кукурузном экстракте, выделены низкомолекулярные вещества с ингибиторными свойствами. Эти вещества ингибировали прорастание и рост конидий *Botrytis allii*. Летучие ингибиторы, которые выделял штамм *T. virens*, до некоторой степени подавляли рост *Sclerotium rolfsii* в культуре. Впоследствии выделено большое число антибиотиков, которые образуют члены рода *Trichoderma*. Недавние исследования механизмов биологического контроля *Trichoderma virens* показали, что антибиотическая продукция практически не оказывает влияния на эффективность биоконтроля.

Антибиоз возникает в результате взаимодействия с низкомолекулярными веществами или антибиотиками, произведенными *Trichoderma*, которые предотвращают рост других микроорганизмов. Показано, что большинство штаммов *Trichoderma* синтезируют изменчивые и энергонезависимые токсичные метаболиты, которые препятствуют колонизации других микроорганизмов (Lorito et al., 2006).

Во многих работах показано, что мутанты, дефицитные по антибиотикам, теряют свою биоконтрольную активность против ряда патогенов. Однако, возможно, что какой-то очень важный для биоконтрольной активности штамма антибиотик вовсе отсутствует у не менее активного биоконтрольного штамма *Trichoderma*. Например, видимо, антибиотик глиотоксин, продуцируемый штаммом *Trichoderma virens*, являющимся основой препарата Soil Gard, очень важен для активности препарата, но этот антибиотик не образуется штаммом T-22. Картину осложняет тот факт, что антибиотики синергичны со многими биоконтрольными ферментами.

До того, как образование антибиотиков родом *Trichoderma* стали связывать с контролем болезней растений, некоторую сомнительность данных об антибиотиках в ранней литературе можно объяснить тем, что для характеристики таких веществ их надо было обязательно выделить и очистить. Впервые образование глиотоксина было установлено для штамма *Trichoderma virens*, глиотоксина и виридина для штамма *T. viride*. Было сообщение о том, что штамм *T. viride* продуцировал виридиол, но, скорее всего, это был штамм *T. virens*.

Возможно, что первыми авторами, которые оценили роль антибиотиков, образованных видами *Trichoderma*, для биоконтроля патогенов растений, были Денис и Вебстер (цит. по Howell, 1998), описавшие изоляты, выделяющие летучие антибиотики, с интенсивным кокосовым запахом.

Влияние антибиотических веществ *Trichoderma* на фитопатогены

Алкилпироны – выделены из культур *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* и *T. hamatum*. Показана антибиотическая активность этого вещества против нескольких патогенов растений и фитотоксическая активностью против рассады салата (Howell, 1998; Reithner et al., 2006; Stoppacher et al., 2006).

Изонитрилы – изонитрин А эффективен против грамположительных и грамотрицательных бактерий и против грибов. Показано, что изонитрин D обладал высокой активностью против грибов, но не против бактерий. Другие антибиотики этого типа обладали низкой антимикробной активностью.

Поликетиды – харзианолид, который был выделен из культуры *T. harzianum*, подавлял рост возбудителя офиоблеза и в опытах в теплицах обладал самой высокой активностью против болезни (Gutierrez et al., 2006). Гомологичное вещество, выделенное из другого штамма *T. harzianum*, подавляло прорастание конидий и хламидоспор *Fusarium oxysporum* f. spp. *melonis* и *vasinfectum*. Данный штамм снижал заболеваемость фузариозом дыни и хлопчатника.

Пептаиболы – класс линейных пептидов, обладающих высокой антимикробной активностью против грамположительных бактерий и грибов. Пептаиболы воздействуют синергично с ферментами деградации клеточной стенки, ингибируя таким образом рост микопатогенов, и повышают резистентность растений к патогенам (Gutierrez et al., 2006; Stoppacher et al., 2006). В опытах с растением табака экзогенное внесение пептаиболов инициировало защитный ответ и снижало чувствительность растения к ВТМ (Benitez et al., 2004).

Исследования действия трихорзианинов на *Sclerotium rolfsii* показали, что трихорзианин А снижал радиальный рост патогена на 70%, а трихорзианин В – на 36%. Кроме того, трихорзианин А ингибировал радиальный рост штамма *T. harzianum*, из которого были выделены испытываемые антибиотики.

Дикетопиперазины – выделяют Р и Q группы *Trichoderma*, сходные по составу и количеству синтезируемых литических ферментов и одинаковому метаболизму стимуляторов прорастания фитопатогенов синтезируемых растением, но различающихся по продукции антибиотиков:

1. Q тип обнаружен у *Trichoderma virens*. Синтезируемый антибиотик глиотоксин является активным фактором контроля *Rhizoctonia solani* на семенах картофеля. Была установлена корреляция синтеза глиотоксина с эффективностью биоконтроля заболевания проростков циннии, вызываемого *R. solani* и *Pythium ultimum*, при выращивании на гидропонике в теплицах. Показано, что глиотоксин ингибирует мицелиальный рост, образование спорангия и подвижность зооспор многих видов рода *Phytophthora*. Они более активно контролировали болезни, вызываемые *R. solani*, чем штаммы, не образующие антибиотик.

2. Р тип. Антибиотик глиовирин, синтезируемый штаммами *T. virens*, был чрезвычайно токсичен для *P. ultimum*. По этой причине Р штаммы считались по данным Ховела более активными биоконтрольными агентами, чем Q штаммы (Howell, 1998). По данным Бенитез есть примеры синтеза повышенного количества антибиотиков мутантами *T. virens*, продуцирующими глиовирин, которые обеспечивают контроль, подобный штаммам дикого типа. Мутанты, не способные к синтезу глиовирин, были не в состоянии защитить рассаду хлопка от *Phytophthora ultimum*, тогда как родительские типы могли (Benitez et al., 2004).

Обе группы (Р и Q) являются и фитопатогенами, что проявляется в способности при инфицировании к проникновению в корневой эпидермис и кортекс растения. Однако они отличались по способности индуцировать фитоалексины в корнях, как было показано на примере хлопчатника. Развитие Q штамма в корневых

тканях подавлялось высокими дозами фитоалексинов, а дальнейшее развитие Р штаммов, слабых индукторов фитоалексинов, не подавлялось, что приводило к развитию фитопатогенеза в последнем случае.

ВЭЖХ-анализ экстрактов корней проростков хлопчатника, обработанных штаммами обеих групп, подтвердил эти данные: Q штаммы индуцировали у растений высокий уровень синтеза фитоалексинов и, таким образом, ингибировали патогенез корней, по сравнению с «Р» штаммами, которые были неспособны индуцировать синтез фитоалексинов, что делало их патогенными для чувствительных семян. Поэтому штаммы Q группы являются эффективными биоконтрольными агентами, ингибируют патогенез корней, индуцируя в них синтез фитоалексинов (Howell, Puckhaber, 2005).

Сесквитерпены. Гептелидовая кислота обладает антибиотической активностью против анаэробных бактерий и против *P. ultimum* и *R. solani* и также ингибирует биосинтез холестерина. Из культуры *T. virens* был выделен каротан сесквитерпен САТ-603, который обладал антигрибной активностью (Stoppacher et al., 2006).

Стероиды. Антибиотик виридин подавлял прорастание спор многих грибов. Виридин в комбинации с глиотоксином также являлся фактором биоконтроля против черной гнили картофеля. Недавно была установлена корреляция между образованием виридина культурой *T. virens* и подавлением роста *P. ultimum* и *R. solani*, а также прорастания склеротий *Sclerotium rolfsii*.

На субстрате с низким содержанием азота штаммы *Trichoderma virens* также синтезируют стерол виридиол. Виридиол является сильным фитотоксином при попадании на корни или семена. Он вызывал некроз прорастающих семян редиса. Поэтому виридиол использовали как гербицид, т.к. он подавлял развитие многих сорняков (Pardovitz-Kedmi et al., 2006). Однако, как оказалось, способность к синтезу виридиола не является причиной наблюдаемой фитопатогенности у изолятов *Trichoderma*.

Комбинированное использование гидролитических ферментов и антибиотиков приводит к проявлению большей степени антагонизма. Хорошо известны синергические эффекты эндохитиназы *T. harzianum* и глиотоксина, а также гидролитических ферментов и пептаиолов при воздействии на прорастание конидий *B. cinerea*. Мутантный штамм 2413 с повышенным уровнем синтеза внеклеточных ферментов и α -перрона действует лучше дикого типа в экспериментах *in vitro* с *R. solani*, и в экспериментах по изучению защиты винограда от *B. cinerea*.

Зависимость антибиоза от физико-химических факторов окружающей среды

Отношение к температуре определяет исход конкуренции между видами рода *Trichoderma*, а также их антагонистическую активность. Так, например, паразитизм *T. koningii* на склеротиях *S. sclerotiorum*, возбудителя белой плесени фасоли, усиливается в присутствии экзогенных источников питания и достигает максимума при температуре 20-35°C и высокой влажности воздуха.

Полученные данные частично позволяют объяснить нередкие случаи неудачного использования видов *Trichoderma* в системе биологической защиты растений от болезней, вызываемых патогенами с низким температурным оптимумом роста (*Fusarium nivale*, *F. avenaceum* и др.), т.к. большинство изолятов *Trichoderma* не активно при температурах ниже 10-15 С.

Великановым (1997) при проведении скрининга грибов-интродуцентов на их активность при разных температурах в опытах *in vivo* было обнаружено изменение направления взаимного антагонизма интродуцента и тест-объекта при разных температурах. При температурах 10 и 15 С изоляты *T. harzianum* Rifai 53 и 86 были

неактивны в отношении *F. avenaceum* и *Bipolaris sorokiniana*. В этих условиях часто наблюдалось подавление роста антагонистов фитопатогенными грибами. При более высоких температурах антагонисты ингибировали рост тест-объектов. Эти данные указывают на необходимость учета температурного фактора при скрининге штаммов-интродуцентов.

Наблюдения при совместном культивировании *T. viride* и *Gliocladium virens* с фитопатогеном *S. sclerotiorum* показали, что температурные оптимумы микромицетов различались. Для роста патогена благоприятной являлась температура 19°C, а для антагонистов – 20-35°C. Таким образом, рост патогена ограничивался двумя факторами: неблагоприятными температурными условиями и действием антагонистов.

При 10°C *Trichoderma* не проявляла антагонистических свойств против *Armillaria melbae*. Однако активизация антагониста происходила при 150°C и 250°C. Для одного и того же вида триходермы было показано, что антагонистические свойства этого гриба изменялись в зависимости от температуры.

Великановым (1994, 1997) была изучена зависимость антагонистической активности 14 штаммов *T. harzianum* в отношении *F. avenaceum* и *B. sorokiniana* на питательных средах с разными источниками азота. На среде с пептоном все антагонисты подавляли рост и споруляцию патогенов на 50-100%. Отмечены случаи нарастания антагонистов на колонии тест-объектов. У *B. sorokiniana* в присутствии пептона уменьшалась интенсивность пигментации спор и гиф, что снижало его устойчивость к действию антагонистов. На средах с минеральными источниками азота (KNO_3 и $NaNO_3$) влияние антагонистов на рост и спорообразование фитопатогенов было слабее, т.к. у последних пигментация была интенсивнее, что повышало их устойчивость к действию *T. harzianum*.

Соколовой с соавторами показано, что изоляты *Trichoderma spp.* оказались весьма чувствительными к ДОН – экстрацеллюлярному цитотоксическому метаболиту фитопатогенных видов *Fusarium culmorum* и *F. graminearum* (Соколова и др., 2006).

Модификация ризосферы. Окружающая среда почвы влияет на прорастание споры, образование хламидоспоры и производство вторичных метаболитов, как, например, сидерофоры, антибиотики и ферменты (Arst, Peñalva, 2003). Есть данные, описывающие ризосферные модификации ВСА, которые препятствуют колонизации патогенными микроорганизмами. К ним относятся антибиотики и токсичные метаболиты, продуцированные микопаразитными грибами.

Изоляты *Trichoderma* наиболее эффективны для биоконтроля в качестве высококонцентрированного инокулята (Hjeljord, Tronsmo, 2003). Их антагонизм по отношению к другим грибам может быть результатом интенсивного дыхания перед прорастанием. В богатой питательными веществами среде почти все конидии *Trichoderma atroviride* P1 (P1) инициировали процесс прорастания и увеличили дыхание в плотной суспензии. При совместной инокуляции 1×10^7 P1 конидий/ml *Trichoderma* с 1×10^5 *Botrytis cinerea* конидий/ml содержание растворенного кислорода снизилось до <1% в течение 2 часов, и патоген не смог прорасти. Более разбавленная суспензия P1 поглотила кислород медленнее, что было достаточно для прорастания коинокулированного *B. cinerea*. На бедной среде меньшее число P1 инициировали прорастание. Потребление кислорода инокулятом и ингибирование *B. cinerea* возрастало, когда конидии P1 были активированы питательным субстратом перед инокуляцией.

Предростовое дыхание также влияло на конкурентоспособность антагониста на твердых субстратах, где респираторный CO_2 стимулировал прорастание и начальный рост колонии. Эти параметры коррелировали с концентрацией инокулята ($R^2 \geq 0.97$, $P < 0.01$). После инициации прорастания конидии *Trichoderma* стали более

чувствительными к высушиванию и погибали в результате сушки уже после 2 ч при инкубации на богатой питательной среде при 23°C. Эти результаты показывают, что изменения, индуцированные питательным субстратом, предшествующие прорастанию конидий *Trichoderma* могут увеличить или снизить их потенциал биологического контроля, в зависимости от условий окружающей микросреды. Показатель pH среды – один из главных факторов, влияющий на деятельность как *Trichoderma*, так и факторов патогенности различных микроорганизмов. Для отдельных антибиотиков была показана чувствительность (деградация) к высоким значениям pH (Delgado-Jarana et al., 2003). Способность грибов рода *Trichoderma* модифицировать pH почвы – важный компонент механизма антагониста, отвечающего за восстановление супрессивности. Некоторые виды *T. harzianum* способны к регуляции pH окружающей среды, обеспечивая, таким образом, оптимальные значения для своих собственных ферментов и неблагоприятные для фитопатогенов. Это уменьшает вирулентность фитопатогенов, потому что большинство его соединений (факторов патогенности) не может синтезироваться в широком диапазоне pH, и действует только в пределах очень узкого диапазона (Prusky, Yakoby, 2003).

Были получены мутанты *Trichoderma* штамм 2413 PacC-c и PacCc (PacC – транскрипционный активатор щелочувствительных генов и гена-репрессора кислоты в щелочных условиях), которые проявили фенотипы, подобные *Fusarium oxysporum* относительно их поведения при различных pH факторах. Они могут быть использованы для интродукции в окружающую среду с не характерным для дикого типа pH (Benítez et al., 2004). Кроме того, показано, что в основе антибиоза может лежать конкуренция за субстрат и необходимые элементы (Fe, Mn и т.д.). Так было показано, что *T. harzianum* T35 может управлять *Fusarium oxysporum*, конкурируя как за колонизацию ризосферы, так и за питательные вещества. Конкуренция оказалась особенно важной для биоконтроля в почве численности также и *Botrytis cinerea* – главного патогена в течение пред- и постурожайного периода во многих странах.

Есть данные, описывающие ризосферные модификации ВСА, которые препятствуют колонизации патогенными микроорганизмами; например, антибиотики и токсичные метаболиты, произведенные энтомопатогенными, микопаразитическими или микогербицидными грибами (Sharon et al., 2006; Gutierrez et al., 2006; Harman et al., 2006).

Садыковой с соавторами показано, что внесение *Trichoderma asperellum* в почву положительно влияет на минерализацию органических субстратов и меняет грибные популяции (Sadykova et al., 2006).

3.2. *Trichoderma* как возбудитель плесневения культурных грибов

Краткий обзор современного состояния вопроса

Во всем мире встречаются случаи, когда виды рода *Trichoderma* вызывают экономические потери в грибных хозяйствах. *Trichoderma* spp. являются возбудителями болезни, именуемой «зеленая плесень», у таких промышленно важных грибов, как *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Pleurotus* spp., *A. bitorquis* (шиитак), *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. В 1985 получили широкое распространение эпидемии зеленой плесени на фермах по выращиванию шампиньонов в Северной Ирландии, затем по всей Ирландии, Шотландии и Англии, далее инфекция была обнаружена в Нидерландах и затем достигла Германии и впоследствии – повсюду в Европе (Бельгии, Франции, Канаде), Северной Америке, Японии, Китае, Индии и т.д. (Seaby, 1998, Chen et al.,

1999, Samuels et al., 2002, Savoie et al 2001). На 50% ферм Канады проблемы с зеленой плесенью сохранялись до 2000 года. В период заражения компоста потери урожая базидиомицетов выросли с 15 до 40%. В некоторых районах Пенсильвании потери выросли до 100%, и фермеры лишились бизнеса. В настоящее время потери составляют 5%. В различных грибоводческих хозяйствах процент зараженного субстрата колебался от 0 до 85%. Только в Ирландии потери от патогенного биотипа *Trichoderma* Th2 в 1986 году составили 1 млн. фунтов. Был выделен возбудитель заболевания, обозначенный как Th2 (*T. harzianum*). Его споры переносили красно-перечные клещи задолго до эпидемии. Биотип Th4 описан в Британской Колумбии в 1990 году, в Онтарио в 1992 году, в других районах в 1996 году. В Голландии первые случаи проблем с *Trichoderma* в 70-х годах связаны с изменением pH почвы до 7,6. Эпидемия же разразилась уже в 80-х годах.

Агрессивные биотипы *Trichoderma* – антагонисты культивируемых грибов – были выделены из окружающей среды как возбудители гнили листового опада (Ospina-Giraldo et al., 1999). Патогенные виды *Trichoderma* ингибировали жизнедеятельность автохтонных бактерий компоста, используемого для выращивания *Agaricus*, что способствовало быстрой адаптации патогенов к новым условиям (Savoie et al., 2001a). У культур *A. bisporus* не было обнаружено никаких механизмов защиты от атаки агрессивных биотипов *Trichoderma* (Mamoun et al., 2000; Mumpini et al., 1998).

Патогенный вид *Trichoderma* проявлялся как налет белого цвета на компосте, и в итоге приобретал темно - зеленый цвет с формированием большой массы спор (Chen et al., 1999).

Идентификация патогенных видов *Trichoderma*

В период появления первых признаков инфекции было идентифицировано 7 видов *Trichoderma* с помощью морфологических методов с использованием ключа Рифай (Rifai, 1969). Выделенные виды были разделены на 11 таксонов, включающих в том числе и 4 биотипа с *T. harzianum*. Три из них (Th1, Th2 Th3) были обнаружены в Англии и Ирландии. Th4 обнаружен в Северной Америке (Chen et al., 1999; Samuels et al., 2002).

Ранее определенные как *Trichoderma harzianum* биотипы Th2 из Европы и Th4 из Америки с помощью молекулярных методов были переопределены как *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* и *T. aggressivum* f. *aggressivum*, соответственно (Chen et al., 1999; Samuels et al., 2002). Биологические формы *T. aggressivum* f. *aggressivum* и *T. aggressivum* f. *europaeum* отличались друг от друга и от других видов *Trichoderma* по морфологическим, культурным и молекулярным признакам. Биотипы Th1 и Th3 были идентифицированы как *T. harzianum* и *T. atroviride*.

Для разделения по скорости роста Th4 от других видов *Trichoderma* использовали 96-луночные плашки. В каждой лунке фотометрировали скорость роста изолятов, методом RAPD и ПЦР не смогли отделить Th2 и Th4 от 17 изолятов, выделенных в США. Был выделен изолят Th1 (*T. inhamatum*), который по данным сиквенирования рДНК отличался от Th3. 129 изолятов *Trichoderma* выделены с 16 грибоводческих ферм и идентифицированы как *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum*. Начиная почти с 1990 г. на Севере Америки, эпидемия зеленой плесени гриба *Agaricus bisporus* была вызвана *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Было предположено, что микроэволюционное появление *T. aggressivum* f. *aggressivum* совпало с началом эпидемии (Chen et al., 1999). Эта гипотеза была проверена дальше с помощью определения восприимчивых к болезни базидиальных грибов, которые культивировались перед эпидемией. Два пред-эпидемических штамма были более восприимчивы к зеленой плесени, чем три пост-эпидемических штамма, выращенные во время эпидемии (Chen et al., 2003). В Австралии в 9 случаях обнаружения зеленой плесени было выделено 6 изолятов, которые оказались типичными Th3, а 3 других изолята были определены как Th1-

australia (идентичных *T. inhamatum* по Каталогу CBS). Эпидемии зеленой плесени, сравнимой с эпидемиями в Европе и Америке, в Австралии не было. Однако на грибных хозяйствах из окружения шампиньонов выделили 7 новых изолятов, идентифицированных как *T. inhamatum* и *T. parceramosum*.

В литературе часто приводились данные о том, что шампиньоны поражались видом *T. koningii*, который вызывал гниение грибницы и зарастание ее белым мицелием паразита, который быстро пролиферировал. Эти симптомы могли наблюдаться в случае роста Th2 на таре и на шампиньонах (Seaby, 1998). Феномен развития большого количества мицелия можно объяснить тем, что *T. koningii* и Th2 быстро растут, но медленно споруют и часто растут на живых шампиньонах.

Механизм взаимодействия патогенных биотопов *Trichoderma* с базидиомицетами

Сравнительный биохимический анализ агрессивных и неагрессивных штаммов *Trichoderma*, колонизирующих растительный субстрат шампиньонов и плодовые тела грибов, показал, что агрессивные штаммы давали большую биомассу при росте на растительном компосте в отсутствие шампиньонов (Williams et al., 2003). Только агрессивные штаммы выделяли в среду хемозластазу и трипсин подобную протеазу и дополнительные хитиназы при атаке базидиомицета. Важным фактором распространения заболевания зеленой гнили авторы считали колонизацию субстрата сапрофитными штаммами *Trichoderma*, которые продуцируют ксиланазы, целлюлазы и ламинариназы, что приводит к деградации соломы, как части компоста, появлению широкого спектра сахаров, что облегчает колонизацию посевов шампиньонов агрессивными штаммами.

Микопатогенная активность штаммов *T. harzianum*, которые используют для защиты растений, обеспечивается продукцией антибиотиков, нарушающих целостность клеточной стенки фитопатогенов, и секрецией ферментов, деградирующих клеточные стенки грибов фитопатогенов, таких как хитиназы, β -1,3- и β -1,6-глюканы, протеазы и α -1,3-глюканы (Ait-Lahsen et al., 2001). Механизм защитной реакции *L. edodes*, заключающийся в секреции внеклеточных лакказ, возможно, индуцирует выделение у *T. aggressivum* ферментов, разрушающих клеточные стенки базидиомицетов (Savoie et al., 2001a).

Образование увеличенных гиф, коричневых линий и выделение лакказы – это защитные реакции *L. edodes*, *Pleurotus eryngii* и *Pleurotus ostreatus* при конфронтации с мицелием *T. aggressivum* или с экстрацеллюлярными метаболитами патогенна (Savoie et al., 2001b). Эти свойства дополняют способность грибов проявлять устойчивость к *Trichoderma* spp. Подобные реакции наблюдаются при культивировании *L. edodes* также и на субстратах, содержащих лигноцеллюлозу (Savoie, Mata, 1999). Конкурентная способность *L. edodes* была улучшена путем модификации состава среды культивирования инокулята, в результате случаи появления *Trichoderma* spp. были снижены. Одна из модификаций заключалась в добавлении в среду культивирования базидиомицетов богатых лигнином и фенолами компонентов, которые могут индуцировать лакказу и всю защитную систему (Savoie et al., 2000).

Во Франции Савой и Мата (Savoie, Mata, 2003) изучали возможность увеличения резистентности грибницы шампиньонов к *Trichoderma aggressivum* путем индукции защитных реакций до контакта с патогеном. Были изучены 29 изолятов *Agaricus bisporus*, 29 изолятов *Lentinula edodes* и 18 изолятов *Pleurotus* spp. Воздействие метаболитов *T. harzianum* на рост мицелия изолятов измеряли на среде YMEA (дрожжи, крахмальный экстракт, агар). В среду добавляли лизирующие ферменты *T. harzianum* (Sigma[®], L1412). Лизирующие ферменты оказывали отрицательное воздействие на рост мицелия исследуемых изолятов базидиомицетов, но некоторые изоляты *L. edodes* и *Pleurotus* spp. адаптировались к действию лизирующих ферментов. В том случае, когда мицелий первой культуры, выращенной на среде с лизирующими ферментами, переносили на среду YMEA с лизирующими ферментами, скорость роста

вторичной культуры не отличалась от контроля. В случае *A. bisporus* наблюдали только частичную адаптацию у нескольких изолятов. Эффект адаптации к лизирующим ферментам *T. aggressivum* изучали для одного штамма из каждой группы. *Trichoderma aggressivum* наносили на край 5-9-суточной старой грибной колонии. На колонии *Agaricus bisporus* происходило образование коричневых точек, и *T. aggressivum* нарастал на мицелии шампиньонов. На колониях *Lentinula edodes* и *P. Ostreatus*, выращенных на среде YMEA с добавлением лизирующих ферментов, образовались коричневые линии, блокирующие продвижение *Trichoderma*. Эти линии проявлялись на 3 сутки при росте грибов в среде YMEA без лизирующих ферментов и через 2 суток при росте на YMEA с лизирующими ферментами. Увеличение резистентности путем индукции некоторыми метаболитами, выделяемыми их антагонистами в ростовую среду, явилось методом защиты культивируемых грибов.

Существует необходимость селекции штаммов *A. bisporus* со способностью адаптироваться к внеклеточным метаболитам *Trichoderma*. Обычно все эксперименты проводились с одним изолятом каждого вида. Для того чтобы дополнить это исследование, были испытаны несколько изолятов видов *A. bisporus*, *L. edodes* и *Pleurotus* spp. на способность к адаптации к метаболитам *Trichoderma*. Для изучения индукции активности лакказы и адаптации *L. edodes* к токсическим фенольным веществам предложен метод культивирования в среде с химическим индукторами. В исследовании сравнивали скорость роста мицелия первой и второй культур в присутствии лизирующих ферментов и без них. В основном дикие изоляты *A. bisporus*, как и исследуемый штамм, в значительной степени подавлялись лизирующими ферментами. Адаптация к лизирующим ферментам в случае *L. edodes* и *Pleurotus* spp. проявлялась как сохранение скорости роста вторичной культуры в присутствии лизирующих ферментов, практически неотличимой от контрольной, тогда как первичная культура подавлялась лизирующими ферментами. Вариабельность каждой группы различалась. Корреляции между генетической гомологией и способностью адаптации изолятов к лизирующим ферментам не наблюдалась. Например, изоляты Le 17, Le 18 и Le 19 являлись гибридами, полученными путем скрещивания Le 02 и Le 03, но они не объединены в одну группу. Pl 14 и Pl 15 являлись гибридами от скрещивания Pl 12 и Pl 13. Pl 15 был близок Pl 12, но Pl 14 не входил в одну группу с Pl 12 или Pl 13. В опытах использовали три вида *Pleurotus*, полученные из разных континентов. Они входили в одну группу с изолятами *L. edodes*. Вариабельность их способности к адаптации к лизирующим ферментам была не так значительна, как у диких изолятов *A. bisporus*, полученных из Франции. Некоторые изоляты *A. bisporus* входили в одну группу с изолятами *L. edodes* и *Pleurotus* spp. Для этих изолятов характерно более высокое соотношение скорости роста мицелия в опыте по сравнению с контролем. Обнаружено, что адаптация данных изолятов выразилась в улучшении роста мицелия вторичной культуры.

Итак, для селекции устойчивых штаммов необходим масштабный скрининг для обнаружения диких изолятов *A. bisporus* со способностью адаптации к экстрацеллюлярным метаболитам *Trichoderma*. Увеличение резистентности к антагонистам путем введения в среду культивирования некоторых метаболитов антагониста представляет собой многообещающий подход в защите грибов.

В более ранних работах показано увеличение лакказной активности на поверхности между грибами, разрушающими древесину, или между *Trichoderma* sp. и базидиомицетами, вызывающими бурую гниль (Rayner et al., 1994, Score et al., 1997). Показано, что резистентность *Lentinula edodes* к атаке *Trichoderma* spp. была обеспечена продукцией большого количества лакказы (p-фенол оксидазы EC 1.10.3.2) и заградительными линиями коричневого цвета в зоне контакта. Экстрацеллюлярные метаболиты *T. harzianum* индуцировали синтез лакказы (Savoie et al., 1998). Показано, что эти экстрацеллюлярные метаболиты, определенные как фракция энзимов, образующаяся после обработки *Trichoderma* лизирующими ферментами, увеличивали

активность внеклеточной лакказы и снижали биомассу *L. edodes*. В то же время культуральная жидкость, содержащая лакказу, подавляла рост биомассы *T. aggressivum*. Без преинкубации в культуральной жидкости *L. edodes* биомасса патогена не отличалась от контрольной и при инкубации в культуральной жидкости *L. edodes*, выращенной в среде без лизирующих ферментов, происходила стимуляция роста биомассы патогена.

Производство компоста для культивирования культурных грибов. В Северной Америке обычно использовался многокомпонентный компост, куда входили кукурузные початки, шелуха, кокосовые отжимки и виноградный жом. Ингредиентами компостов в Европе обычно являются пшеничная или ячменная солома, древесные опилки и куриный помет, отходы птицеводческих хозяйств. Солома увлажняется в специальных емкостях водой, прошедшей цикл на компостном дворе. Затем солома смешивается с куриным пометом (в соотношении 10:7 v/v). Масса выкладывается в виде грядок на лошадиный навоз или куриный помет. Мочевина может быть добавлена в солому для повышения процентной доли азота. Через 1-3 недели ферментации компост переносят в траншею, где он перемешивается и нагревается. Когда содержание аммиака снижается до 10 мг/кг (ppm) компост охлаждается холодным воздухом до 17°C и упаковывается машиной для продажи. Во время второй фазы содержание сухого вещества в компосте возрастает с 24 до 42%, а содержание азота составляет 1,6 – 3,2% в пересчете на сухой вес.

В Ирландии, где субстрат использовали в тюках или мешках, редко кто прогревал их до 60°C для уничтожения патогенов. Когда тюки переносили в тележку трактора в помещении, некоторое количество пыли попадало в систему вентиляции. Более того, до 1985 года для защиты от загрязнения использовали минимальное количество дезинфектантов, и именно тогда началась эпидемия Th2.

В марте 1985 года грибоводы получили компост от одного производителя из Северной Ирландии, на мешках с компостом были белые пятна. Эти белые пятна быстро стали зелеными после прорастания спор *Trichoderma*, и это произошло очень быстро после заражения. На этом субстрате был получен скудный урожай, который был часто заражен красным перечным клещом (*Pygmephorus mesembrinae*). Клещики перемещались от мешка к мешку и концентрировались на шампиньонах, что делало продукт нетоварным. Каждый месяц количество зараженных мешков увеличивалось. В 1986 году потери грибоводов, использующих этот компост, составили 30%. Некоторое количество субстрата было возвращено производителю. Этот субстрат хранился на компостном дворе и снова поставлялся грибоводам, что привело к перекрестной контаминации.

Лабораторные и полевые тесты для определения вирулентности Th2

Опыты *in vitro* проводились для сравнения вирулентности Th2 и других выделенных из компоста видов. Колонизацию оценивали по 5-ти балльной системе. Уровень 1 означал, что рост был ограниченным и наблюдался в пределах инокулюма; уровень 5 означал полное прорастание компоста. Результаты показали, что Th2 оказался самым вирулентным таксоном (в том числе по сравнению с Th4). Уровень колонизации Th2 составил 3,56 балла по сравнению с уровнем 1,25 балла для Th3 и уровнем 1 балл для Th1 и другими микроорганизмами компоста. Уровень колонизации Th2 значительно повышался при 27°C и снижался при 18°C или 22°C. При температуре 30°C даже Th1 становился потенциально опасным.

Показано, что культура Th2 развивалась только в автоклавированном или стерилизованном микроволновым излучением компосте или в компосте, на котором выращена культура шампиньонов *Agaricus*. Однако Себи (Seaby, 1998) обнаружил, что культура Th2 способна развиваться в компосте без *Agaricus*, даже при отсутствии посевных гранул.

Пути, приводящие к заражению компоста, лотков и поддонов:

- *Нарушение технологии производства грибов.* Зеленая плесень обнаружена в Австралии на двух фермах, где грибы выращивали на мешках, и на одной ферме, где использовали лотки, и не выявлена ни на одной ферме, где использовали поддоны.

- *Недостаточное прогревание торфа.* Недостаточное прогревание торфа может приводить к вспышке зеленой плесени, в зависимости от внесенных спор и вирулентности. Однако, при современном методе прогревания в траншеях и приготовления активного компоста в Ирландии такие случаи редки. В настоящее время производство компоста и грибоводство разделено, что снижает риск перекрестной контаминации от разных ингредиентов компоста изолятом, колонизирующим компост в грибоводческом хозяйстве.

- *Перекрестная контаминация грибоводческой фермы упаковочным оборудованием и машинами.* Даже если получение инокулята и формирование компоста на ферме разделены, мухи и клещи соединяют их. Разносчики *T. viride* биотипа Th4 – мушки, мыши – носители 5 видов, в том числе биотипа Th2, красные клещи (*Pugterphorus mesembrinae*), часто обитающие в мышинных гнездах, – носители спор. Трудно предусмотреть перенос загрязнения из грибницы в упаковочное помещение и обратно с людьми и машинами. В таких условиях вспышка инфекции неминуема.

- *Перекрестная контаминация от отдела компостирования в отдел упаковки.* После прогрева торфа или компоста внешняя куча может быть контаминирована из-за попадания пыли, содержащей споры *Trichoderma* при смешивании ингредиентов компоста.

- *Контаминированный компост, использованный для ручного посева в небольшую тару.* Когда мешок с зараженным компостом используют для проращивания инокулята и ручного посева, то скоро все тары будут покрыты зеленой плесенью, и производство шампиньонов остановится.

- *Случайное заражение посевного материала.* Зеленая плесень может развиваться при хранении случайно от заражения посевного материала мышами или при ручной расфасовке от человека.

- *Перекрестная контаминация от производителя.* Сами работники могут заразить компост, если будут переносить мешки и тару без перчаток и в одной и той же одежде, касаясь зараженных спорами ручек дверей или стен. Небольшие мушки, обитающие в компосте – *Sciarids*, *Phorids*, а также мыши могут участвовать в этой передаче, передвигаясь от мешка к мешку.

- *Заражение компоста при компостировании через пыль* (электростатическое притягивание пыли к полиэтилену, используемому для укрытия компостных траншей), пыль в системе вентиляции и в полевых условиях, полиэтилен также представляет идеальную стерильную поверхность для начального развития биотипа Th2. Пластиковое покрытие блоков также могло за счет электростатики притягивать пыль, содержащую споры Th2.

- *Рост Trichoderma стимулируется CO₂* по сравнению с *Agaricus* в мешках с компостом, где концентрация двуокиси углерода достигает 3%.

- *Не достаточный уровень дезинфекции тары при компостировании.*

- *Различные добавки в компост.*

- *Переполнение компостных траншей.* Отмечена корреляция между контаминацией зеленой плесенью и переполнением компостных траншей.

- *Контаминированность биотипами Th2* во время эпидемии производственных поверхностей (стены, пол, покрытия, машины, тюки, емкости с посевными зёрнами), полустерильные поддоны, используемые для заполнения компостом перед посевом базидиомицетов (Seaby 1998).

- *Оптимальная температура* для развития зеленой плесени является 25-30°C.

Через 24 суток после нанесения спор на поддоны, все поддоны были заражены зеленой плесенью.

- Показано, что при увеличении рН компоста до 7 колонизация *Trichoderma* spp. увеличивается. Прогревание лотков с компостом приводит к разрастанию *T. viride*, Th1 и других *Trichoderma* spp, которые потом попадают на тару.

- Препарат BINAB-T (смесь *T. harzianum* и *T. polysporum*) был создан для контроля гнили древесных пород и испытывался как агент для контроля *Verticillium* spp. на таре. Однако при испытании на грибнице показано, что препарат стимулировал развитие клещей и поражал шампиньоны.

- На ферме, где использовали алюминиевые лотки, большие разрастания Th2 наблюдали на дне сеток, в которых был компост. Компост, упакованный в стенки, трудно стерилизовать. Поскольку на ферме не было оборудования для прогрева компоста, то после заполнения лотков, края среды были контаминированы.

- Известно, что компостные бактерии лизируются шампиньонами. Таким образом, *Agaricus* как бы облегчает рост Th2, поскольку способствует элиминации компостных бактерий.

- Патогенные биотипы подавляют рост сапротрофных бактерий компостов, что способствует распространению эпидемии.

- Результаты полевых экспериментов, в которых анализировали 20 кг мешки с компостом, показали, что одна зараженная посевная гранула, помещенная в свежий компост, через 7 суток приводит к появлению колонии паразита диаметром 30 см, спорующей через 24 суток. Однако, заражение, произведенное через 14 суток после прорастания шампиньонов, приводит к появлению 4 небольших колоний на 38 суток. На этой стадии возможно внесение микроэлементов, улучшающих рост шампиньонов (железо, цинк, медь или магний), но это не снижает уровень заражения зеленой плесенью.

Ингибирование процесса распространения эпидемии

1. Требуется прогревание субстрата в течение 42 ч при 68°C. Если эта температура приводит к нежелательному изменению свойств субстрата, можно снизить температуру, но увеличить время обработки.

2. Установлена корреляция между типом добавки в компост и контаминацией *T. aggressivum* f. *aggressivum*. Удивительно, что перьевая добавка увеличивала урожай шампиньонов в присутствии патогена, а другие добавки снижали урожай.

3. В Австралии (где *T. aggressivum* f. *euroaeum* не была обнаружена) внесение в компост 3×10^8 спор культуры, идентифицированной как *T. harzianum*, приводило к развитию симптомов зеленой плесени. Однако внесение 3×10^3 спор вспышки инфекции не вызывало. Таким образом, потери урожая зависели от количества спор патогена.

4. Полевые опыты показали, что против патогена эффективны только сильные дезинфектанты, такие, как основной фенол. Формальдегид быстро испаряется и провоцирует быструю повторную колонизацию, особенно в упаковочном помещении.

5. В Австралии для контроля патогенов использовали дезинфицирующие вещества, самым активным из которых оказался фенол.

6. В Америке для решения проблемы рекомендуется снижение количества посевного материала и обеззараживание, прогревание и защита компоста от контакта с людьми, насекомыми и клещами. Также рекомендовалось оптимизировать процесс приготовления компоста и подобрать самые оптимальные условия только для *Agaricus*.

7. Увеличение резистентности путем введения в среду культивирования базидиомицетов некоторых метаболитов патогенов.

8. Посевные гранулы шампиньонов представляли собой источник пищи для *Trichoderma*. Обнаружено, что опыление посевных гранул фунгицидом бензимидазолом значительно снижало потери урожая.

9. Из компоста выделены бактерии, которые способны подавлять развитие

Trichoderma. Необходимо увеличивать их количество или создавать для них оптимальные условия.

3.3. Влияние грибов рода *Trichoderma* на человека

Все чаще виды *Trichoderma* признаются патогенными в иммунологической супрессии хозяина (Miguela, 2005). Среди сапрофитных видов рода *Trichoderma* некоторые изоляты вызывают у людей аллергические заболевания верхних дыхательных путей, например *T. viride*. Некоторые представители *Trichoderma*, особенно *T. viride*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* являются возбудителями перитонита (Kuhls et al. 1999). Они участвуют в продолжительном амбулаторном перитоническом диализе, ассоциированном с перитонитами и инфекциями иммуновосприимчивых пациентов с гематологической злокачественной опухолью или при трансплантации органов. *T. longibrachiatum* является основным участником этих инфекционных процессов. Есть данные о несмертельной легочной инфекции, вызванной *T. viride* у пациента с лейкемией. Этот штамм выделен из организма 54-летней пациентки, перенесшей химиотерапию острой миелоидной лейкемии. Минимальные ингибирующие концентрации для организма были следующие: амфотерицин (0.25 Ag/mL) и вориконазол (2 Ag/mL). Наибольшую опасность плесневые грибы, к которым относятся и грибы рода *Trichoderma*, представляют в городской черте. Современные города – особые экосистемы, отличающиеся по физико-химическим свойствам почв и атмосферы, структуре сообществ животных, растений, микроорганизмов, наличию большого числа сооружений из созданных человеком материалов, высокому уровню загрязнения внешней среды от зональных биогеоценозов. В городах, как правило, создаются более теплые климатические условия, атмосферный воздух в большей степени насыщен окисями углерода и азота. Для формирования микобиоты большую роль играет наличие различных элементов инфраструктуры – дорожных покрытий, поверхностей зданий из разных материалов и т.д., на которых может происходить развитие грибов (Марфенина и др., 2002).

С давних времен постулировалось, что наличие влажности и плесени в доме и на работе оказывает вредное воздействие на здоровье (цит. по Митрофанов, Козлова, 2004). Установлено, что у лиц, проживающих в сырых, заплесневелых зданиях, значительно больше жалоб на здоровье. Проблемы со здоровьем обнаружены у более чем 6000 детей в шести штатах США. При этом сырость в доме являлась значимым фактором риска для респираторных и других заболеваний в этой возрастной группе. Список симптомов обычно включал жалобы со стороны верхних дыхательных путей, а также головную боль, раздражение глаз, носовые кровотечения, заложенность носа, кашель, простудные симптомы и иногда жалобы со стороны желудочно-кишечного тракта. Однако причинные отношения между влажностью в помещении и заболеваниями до сих пор остаются не вполне ясными. Установление причин такой взаимосвязи осложняется чрезвычайным разнообразием загрязняющих химических веществ, присутствующих в воздухе помещений. Кроме того, окружающая среда внутри помещений содержит самые разнообразные микроорганизмы, а также продукты их метаболизма, включая эндотоксины и микотоксины. Часто бактериальная нагрузка может быть намного большей, чем грибковая.

Известно, что большинство грибов могут выживать в очень широком температурном диапазоне, однако для оптимального роста им необходима высокая абсолютная и относительная влажность (Kildesø et al., 2003). Впрочем, повышение температуры и наличие пригодного для питания субстрата могут способствовать выживанию грибов и при более низкой влажности. Наличие загрязнений, восприимчивой окраски или бумажных обоев не так необходимо для роста плесневых грибов, как влажность. Следует помнить, что, наряду с влиянием на рост грибов,

влажность сама по себе может быть критическим фактором для формирования так называемого, так как она влияет на развитие пылевых клещей и уровень озона. В Дании проведена идентификация изолятов *Trichoderma*, выделенных из зданий, разрушенных просочившейся водой, с помощью ITS1-риботипирования и PCR. Выделенные изоляты проявили высокую гомологию штаммам *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* (Lubeck et al., 2000). Другие авторы для идентификации использовали методы: ВЭЖХ экстрактов культур, морфологическую идентификацию и последовательности rDNA (Thrane et al., 2001).

Список наиболее часто выделяемых в помещениях плесневых грибов представлен в таблице 3.1.

Т а б л и ц а 3.1

Основные плесневые грибы внутри помещений

Род	Источники
<i>Alternaria</i>	Растения, яблоки, капуста, сыры, цитрусовые, фрукты, злаки, свинина, картофель, томаты
<i>Aspergillus</i>	Почва, гниющие растения и овощи, ткани, кожа, текстиль, сыры, консервированное мясо
<i>Basidiomyces</i>	Сухая гниль, древесная гниль
<i>Cladosporium</i>	Мертвые растения, старые оконные рамы, почва, текстиль, кожа, сыры, злаки
<i>Fusarium</i>	Почва, бекон, бобы, кукуруза, морковь, сыры, капуста, лук, картофель, томаты
<i>Penicillium</i>	Почва, компост, гниющие овощи, винные погреба, кожа, ткани, бумага, фрукты
<i>Stachybotrys</i>	Почва, гниющие растения, целлюлоза, сено, солома
<i>Trichoderma</i>	Почва, гниющая древесина. Злаки, фрукты, томаты, сладкий картофель, бумага, текстиль.
<i>Trichophyton</i>	Почва, кожные чешуйки, ногти

Частота выделения грибов в сырых зданиях

Проведенными в Северной Америке перекрестными опросными исследованиями выявлено, что от 27 до 36% домов имеют проблемы с плесенью. Проведенные исследования качества воздуха внутри помещений в самых разных странах представили еще более высокие цифры – от 42 до 56%. В Европе наличие сырости и грибов в домах было обнаружено: в Великобритании – от 17 до 46% домов, в Нидерландах – от 15 до 18% и в Финляндии – в 15% наблюдений. Тревожит тот факт, что признаки наличия плесени или первичные, связанные с сыростью, дефекты обнаружены в 80% выбранных случайным образом домах. Установлено, что в деревянных домах было значительно больше грибов, чем в бетонных. Классифицируя типы грибов из домашней пыли домов, где проживали больные бронхиальной астмой, авторы установили, что вне зависимости от конструкции жилища, наиболее высоким был уровень осмотических грибов (группа А) и грибов, которые выживают в относительно сухих условиях (группа В). Грибы, которые нуждаются в очень высокой влажности (группа D), присутствовали в малых количествах.

Группа А: осмофилы или ксерофильные грибы, преимущественно *Aspergillus restrictus*, *Eurotium* и *Wallemia*.

Группа В: грибы, выживающие длительное время в относительно сухих условиях, преимущественно *Aspergillus* (исключая *A. restrictus*) и *Penicillium*.

Группа С: грибы, выживающие в относительно влажных условиях и чувствительные к недостатку влаги. В эту группу входят многие грибы: *Ascremonium*, *Alternaria*, *Arthrimum*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phoma* и др.

Группа В: грибы, выживающие только в очень влажных условиях и очень чувствительные к «сухости»: *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* и дрожжи.

Оценка экспозиции и технические проблемы в определении содержания грибов в помещениях

Хотя исследования и обеспечивают объективную информацию о микроорганизмах внутри помещений, имеются существенные проблемы, связанные, прежде всего, с методикой забора материала. Самый традиционный метод (выставленные чашки с агаром – метод седиментации по Коху) не обеспечивает адекватные расчеты количества оседаемых микробов из воздуха. Для этого необходимо использование специальных устройств типа пробоотборника Андерсена или аппарата Кротова. Для определения количества спор в воздухе также применяют ловушки Булкарда, где воздух проходит через устройство со скоростью 10 литров в минуту, и частицы оседают на ленте барабана с записью в течение 7 суток. Эти ловушки определяют число спор в кубическом метре воздуха за определенный период времени и могут быть использованы как внутри помещений, так и снаружи. После того, как споры собраны, проводят их микроскопирование. Однако многие споры практически невозможно различить по их морфологии.

Даже используя устройства количественного учета, между практически идентично полученными пробами возможны огромные различия (до 1000 раз). Таким образом, исследование единичных проб воздуха представляется недостаточно достоверным. Кроме того, исследование необходимо проводить без применения «агрессивных» методов забора материала в помещении (например, с использованием пылесоса), когда можно получить более высокие количественные показатели, чем это имеет место фактически. Обнаружено, что механическое воздействие непосредственно на места роста и чистка ковров пылесосом (методы, часто использованные в обзорах) вызывают значительное временное увеличение числа спор в воздухе. Наконец, важную роль при попытке количественного определения некоторых видов грибов может играть размер самих клеток.

Впрочем, существует мнение, что вообще нет необходимости проводить микологическое исследование помещения, если имеется видимый рост грибов, поскольку в любом случае необходимо их удаление (чистка, устранение загрязненного материала) и контроль над влажностью воздуха.

Воздействие на здоровье людей, проживающих в сырых помещениях, оказывают не только споры/клетки грибов, но и клеточные фрагменты, которым до сих пор уделяли мало внимания. Доказано, что мелкие частички (менее 2,5 мкм) четко обуславливают побочные эффекты на здоровье людей. Установлено, что значительное количество иммунологически активных частиц имеют размеры существенно меньшие, чем споры, выделяющиеся с поверхностей, загрязненных грибами. Очень маленькие частички (0,3 мкм) количественно превышали число спор более чем в 320 раз. Проблема распознавания таких частиц состоит в том, что мелкие и очень мелкие клеточные фрагменты невозможно обнаружить традиционными методами исследования образцов биоаэрозолей.

Грибы в помещениях и заболевания человека

Грибы в целом, и плесени, в частности, могут вызывать заболевания человека тремя путями:

1. Прямая инфекция. Плесневые грибы вызывают эти виды заболеваний очень редко и преимущественно у больных с серьезными иммунодефицитными состояниями.

2. Грибы могут вызывать аллергические реакции, которые обычно обусловлены вдыханием или попаданием на слизистые оболочки частиц плесневых грибов. Аллергию могут вызывать как живые, так и мертвые грибы.

3. Грибы могут продуцировать токсины, которые вызывают болезненные реакции у людей и животных. Основным путем поступления их в организм является желудочно-кишечный тракт – с загрязненной токсигенными грибами пищей. Некоторые микотоксины являются очень сильными ядами (Halt, 1998; Thrane et al., 2006).

Большинство исследований, в которых описано влияние на здоровье человека влажности и плесени внутри помещений, базируется на субъективных и ретроспективных (анкетных) опросах. Лишь немногие исследования включали результаты физического обследования или диагностических тестов. В таком подходе заключены очевидные потенциальные проблемы.

Для контроля количества клеток возбудителя аллергии *Trichoderma longibrachiatum* TW-1 – продуцента β -глюканазы в воздухе рабочей зоны сотрудниками ВНИЦ БАН (Россия) разработана специальная методика, позволяющая количественный анализ в диапазоне концентраций от 100 до 6000 клеток в 1 м³ воздуха (Метод микробиологического измерения концентрации..., 2002).

Диагностика микогенной аллергии

Диагностика любых аллергических заболеваний основана на клинических симптомах, кожных пробах и тестах *in vitro* с использованием радиоаллергосорбент-теста (РАСТ) или иммуноферментного анализа (ИФА), реже – на провокационных тестах. Кожные пробы – самый простой метод определения IgE к специфическим аллергенам. Обычно используют два метода для диагностики к аллергенам грибов – это прик-тест (укольный) и внутрикожные пробы. Прик-тест лучше коррелирует с анамнезом, методами определения специфических IgE *in vitro* и провокационными ингаляционными тестами. К тому же внутрикожные пробы дают большее количество ложноположительных результатов, чем прик-тест.

Разнообразие потенциальных аллергенных грибов существенно больше, чем перечень их в имеющихся диагностических аллергопанелях и реагентах для кожных тестов. В связи с этим особое значение придают исследованию проб воздуха, что позволяет, если известны найденные в воздухе виды грибов, сузить спектр используемых тестов.

Аллергические реакции от воздействия плесневых грибов на легочную ткань хорошо описаны в очень широком диапазоне: от воспаления верхних дыхательных путей (риниты) с сопутствующим конъюнктивитом до тяжелой бронхиальной астмы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза и экзогенного аллергического альвеолита (ЭАА).

Микотоксины и их влияние на здоровье человека

Клинические токсикологические синдромы, связанные с попаданием с пищей больших количеств микотоксинов, хорошо описаны у животных в широком диапазоне: от внезапной смерти до замедления роста и снижения репродуктивной функции. Эффекты, оказываемые на людей, значительно менее хорошо определены (таблица 3.2).

Заболевания человека и животных, связанные с микотоксинами

Токсины	Виды грибов	Заболевания
Высоковероятные и четко установленные причинные агенты		
Алкалоид	<i>Claviceps purpurea</i>	Эрготизм (гангренозный и конвульсивный)
Аматоксин	<i>Amanita</i> spp.	Отравление ядовитыми грибами
Афлатоксин	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Афлотоксикоз, гепатит, рак, детский цирроз
Вомитоксин, деоксиниваленол	<i>F. graminearum</i>	Анорексия
Зеараленон	<i>Fusarium</i> spp.	Преждевременное телархе ¹
Охратоксин	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium Viridicatum</i>	Балканская эндемичная нефропатия, опухоль мочеточника
Стеригматоцистин	<i>Aspergillus versicolor</i>	Рак
Трихотецены (Т-2 токсин, ДАС)	<i>Fusarium</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Cephalosporium</i> spp.	Алиментарная токсическая алейкия, стахиботритоксикоз и др.
Эрговалин	<i>Acremonium coenophialum</i>	Отравление овсяницей
Возможные причинные агенты		
Метаболиты	<i>Fusarium equiseti</i>	Болезнь Кашина-Бека ²
Метаболиты	<i>Fusarium graminearum</i>	Болезнь «красной плесени» (Akakabi-byo) ³
Метаболиты	<i>Phoma sorghina</i>	Болезнь Оньялай (Onyalai) ⁴
3-нитропропионовая кислота	<i>Arthrinium</i> spp.	Детский нейротоксикоз
Фумонизин	<i>Fusarium moniliforme</i>	Рак пищевода
Патулин	<i>Penicillium expansum</i>	Опухоли
Пенитрем	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Тремор
Рубратоксин	<i>Penicillium rubrum</i>	Гепатотоксичность
Секалоновая кислота D	<i>Penicillium oxalicum</i>	Тератогенный эффект
Циклопиазоновая кислота	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Отравления Кодуа (Kodua) ⁵
Цитринин	<i>Penicillium citrinin</i>	Нефротоксичность
Маловероятные или ошибочно установленные причинные агенты		
Афлатоксин	<i>Aspergillus</i> spp.	Синдром Рейе ⁶ , квашиоркор
Глиотоксин	<i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> spp.	СПИД
Зеараленон	<i>Fusarium</i> spp.	Цервикальный рак
Т-2 токсин	<i>Fusarium</i> spp.	Пеллагра
Циклоспорин	Various species	СПИД
Цитреовиридин	<i>Penicillium</i> spp.	Кардиальная бери-бери

Примечание:

¹Телархе – раннее преждевременное развитие молочных желез.

²Болезнь Кашина-Бека – дегенеративная артропатия, которую связывают с употреблением воды с высоким содержанием железа.

³Болезнь «красной плесени» (Akakabi-byo) – заболевание, встречающееся только в Японии, которое связывают с употреблением в пищу пораженного плесенью риса и других зерновых культур. Симптомы включают анорексию, тошноту, рвоту, головную боль, боли в животе, понос и судороги.

⁴Болезнь Onyalaí (приобретенная тромбоцитопеническая пурпура) – часто фатальное заболевание, описанное в тропической Африке, сопровождающееся тромбоцитопенией и кровоточащими язвами во рту и в глотке. Считается, что причиной является отравление лекарствами, которые назначают колдуны.

⁵Отравления Кодуа – описанные в Индии отравления загрязненным семенем проса.

⁶Синдром Рейе (Reye's) – редкое заболевание, возникающее в детском возрасте. Оно характеризуется развитием у ребенка энцефалита в сочетании с недостаточностью функции печени. Часто такие симптомы появляются на стадии выздоровления ребенка от какой-либо перенесенной ранее вирусной инфекции. Причина развития данного заболевания неизвестна, однако считается, что одним из виновников его возникновения является аспирин; поэтому данное лекарство не рекомендуется назначать детям в возрасте до 12 лет, если в этом нет особой необходимости.

Из таблицы 3.2 видно, что микотоксины оказывают свое основное токсическое действие при попадании внутрь с загрязненной пищей (Blumenthal, 2004; Thrane et al., 2006). Здесь также отметим следующие положения: во-первых, грибы, загрязняющие продукты, с большой натяжкой можно назвать грибами помещений; во-вторых, если не касаться пищевых отравлений по своей сути, интересен следующий вопрос: может ли человек получить расстройство здоровья, вдыхая микотоксины в виде аэрозолей в реальных условиях жилого помещения? Ингаляционные воздействия больших доз микотоксинов практически связаны исключительно с профессиональными факторами. Связь микотоксикозов с заболеваниями, обусловленными воздействием на здоровье факторов внутренней среды помещений, в настоящее время не доказана.

Показано, что обработка зерновых биологически эффективными биопестицидами, изготовленными на основе грибов рода *Trichoderma*, снижают пораженность пищевой продукции микотоксинами и вытеснение токсинообразующих видов *Trichoderma* и способствуют получению экологически чистой пищевой продукции.

3.3.1. Использование грибов рода *Trichoderma* в медицине

В медицине ферменты и гены грибов рода *Trichoderma* могут быть особенно полезны, так как они имеют сильную фунгицидную активность и высокий уровень синергизма с широко применяемыми противогрибковыми лекарствами, о чем не сообщалось для других хитинолитических ферментов. Ферменты могут быть также использованы для получения детергентов и протопластов и, по причине их фунгицидной активности могут использоваться как стерилизующие растворы.

Показано, что *T. polysporum* (Link ex Pers.) Rifai продуцирует липофильный циклоспорин А. Он обладает различными биологическими и физиологическими действиями: антипаразитическим, фунгицидным, противовоспалительным и иммуносупрессивными свойствами. Циклоспорин А используется в качестве иммуносупрессора после трансплантации органов и при лечении некоторых аутоиммунных нарушений, таких, как псориаз, атопический дерматит, болезнь Бесета. В качестве побочного эффекта наблюдается стимуляция процессов оволосения (hirsutism) (Takahashi, Kamimura, 2001).

С получением NAG, ферменты стали использоваться в качестве пищевой добавки, ростового субстрата и лекарства для лечения желудочно-кишечных дисфункций у людей и животных.

При использовании в интегрированной защите растений должны потребоваться значительно более низкие дозы, чем при химическом типе защиты с применением фунгицидов, а также уменьшить риск появления устойчивых штаммов фитопатогенных микроорганизмов при длительном применении в агроценозах, что позволит получить экологически чистую пищевую продукцию.

3.4. Взаимодействия с растениями

Определение полезных и вредных свойств *Trichoderma* осложняется многообразием взаимодействий видов *Trichoderma* (как тестерных изолятов, так и выделенных из среды) и других микроорганизмов в почве, изменением среды обитания и корневой зоны растений. Ризосферные микроорганизмы продуцируют различные вторичные метаболиты, в частности, фитогормоны, которые поступают в растительный организм, приводя к более активному его развитию (Синчурина и др., 2006). В качестве затруднений, возникающих при интерпретации результатов можно привести работу Тэй (цит. по Bailey and Lumsden, 1998). В данной работе были показаны как полезные, так и вредные воздействия эндогенных видов *Trichoderma* и других микроорганизмов на всхожесть семян перца. Может показаться очевидным, что при отсутствии заболеваний растения развиваются успешно. В данном обзоре будет сделана попытка описать прямые полезные и отрицательные эффекты видов *Trichoderma* на рост растений, будут обсуждены возможные механизмы воздействия на растения.

3.4.1. Отрицательные взаимодействия с растениями

Ингибирование роста растений

Фитотоксические вещества

Много работ посвящено антимикробным веществам, выделяемым видами *Trichoderma*. Вариабельность уровня фунгицидов и гербицидов, выделяемых грибами, влияет на возможность применения видов *Trichoderma* для биоконтроля. Глиотоксин (эпидитиодикетопиперазин) и виридин (производное стирола) являются примерами таких веществ. Глиотоксин и виридин ингибировали всхожесть семян и образование корней гречихи при концентрации 1ppm в чашке Петри. Однако глиотоксин и виридин в дозе 1ppm не влияли на всхожесть и рост семян красного клевера и пшеницы, поскольку растения обладают разной устойчивостью к токсинам. Активность глиотоксина и виридина возрастает скорее при низких значениях pH (pH 4,0), чем при нейтральных (pH 6,0), что объясняется, по-видимому, тем, что при низких pH токсины стабильнее. В основном различные штаммы *Trichoderma* выделяют или глиотоксин, или виридин, и только незначительное число штаммов выделяют оба токсина, но в следовых количествах. Штаммы, выделяющие токсины, ингибировали всхожесть семян белой гречихи даже при высокой концентрации семян. Общим симптомом поражения является хлороз. Штаммы *Trichoderma virens* продуцировали глиотоксин, виридин и глиовирин в синтетической среде без почвы. Токсины обладают гораздо более выраженной антимикозной активностью, чем фитотоксической активностью.

Механизм токсичности данных веществ по отношению к растениям неизвестен. Показано, что глиотоксин ингибировал ацетолактатсинтазу (АС) в растениях. АС участвует в биосинтезе разветвленных аминокислот. Внесение разветвленных аминокислот в ростовую среду снижало токсичность глиотоксина. Глиотоксин также ингибирует активность и других ферментов.

Виды *Trichoderma* также выделяют виридиол, дигидропроизводное виридина. Виридин в процессе метаболизма грибов частично превращается в виридиол. Изоляты *Trichoderma virens*, которые не выделяют виридин, не способны превращать виридин в виридиол. Виридиол является слабым антибиотиком, но сильным гербицидом. Фитотоксичные эффекты виридиола изучались гораздо интенсивнее, чем токсичность других вторичных метаболитов, синтезируемых видами *Trichoderma*. Виридиол, который синтезируется позитивными штаммами, адсорбируется в почве и проявляет максимальную токсичность по отношению к однолетним растениям и меньшую токсичность по отношению к однодольным растениям. Типичными симптомами являются низкая всхожесть семян и недостаточное развитие корневой системы. Возможно, что штаммы *Trichoderma virens*, продуцирующие виридиол, являются некротрофными патогенами. Аккумуляция виридиола достигает пика через 4-5 дней

после инокуляции позитивного штамма и через 2 недели практически не определяется. Виридиол слишком нестабильное вещество, чтобы его можно было использовать в качестве гербицида. Для проявления гербицидного эффекта виридиол должен накапливаться в прикорневой зоне. Жидкий препарат позитивного штамма *Trichoderma virens*, распыленный на почву, инфицированную семенами лебеды белой (*Chenopodium album*), ингибировал прорастание семян сорняка. Виридиол ингибирует прорастание семян и повреждает семена. Инокулят *Trichoderma virens* не оказывал токсического действия на семена хлопчатника, чувствительного к виридиолу. Опасность *T. virens* для урожайной культуры можно снизить путем направленного внесения инокулята. Если вносить *T. virens* в виде смеси с торфом, то общепринятой эффективной дозой является доза 815 кг на га. Такое большое количество инокулята необходимо для достижения гербицидного эффекта. Необходимость внесения значительных количеств инокулята гриба затрудняет использование *T. virens* и других видов *Trichoderma* в качестве гербицидов.

Т а б л и ц а 3.3

Эффект внесения смеси *T. virens*-торф в почву на прорастание семян и вес 14-дневных проростков (Bailey, Lumsden, 1998)

Растение	Прорастание семян, % от контроля	Корни, мг контроль	Корни, мг опыт	Побег, мг контроль	Побег, мг опыт
хлопок	75	44,1	3,4	150,1	41,1
подсолнух	69	31,6	15,4	105,4	48,4
лук	32	1,4	0,2	5,6	0,4
соя	41	59	34,6	176,9	86,7
огурцы	44	16,5	3,5	66,7	11,4
канталупа	25	13,9	0,6	61,7	1,6
зерно	83	103,6	64,1	92,6	36
трава	71	15,5	3,7	32,8	5,4
горчица	33	2,2	0,3	11,9	0,9
томаты	52	2,7	0,1	12,4	0,5
дикий овес	89	30,7	17,8	13,7	6,8
подсолнух	100	30,8	16,3	77,7	31,8
бобы	100	189,6	143,1	434,3	257,1
люцерна	75	6,3	2,1	17,6	3,2
сахарная свекла	100	8,5	1,6	25,2	3,5
шпинат	79	8,1	2,3	19,5	4,3
восточный черный паслен	23	0,9	0,9	2,9	1,3
вьюнок	67	12	3,7	27,7	9,5
мятлик однолетний	40	1,3	0,5	2,2	0,4
лисий хвост желтый	53	6,8	1,5	15,6	2,5
лисий хвост обыкновенный	29	1,8	1,2	2,1	1,9
щавель кудрявый	20	0,6	0,2	2,3	0,9
подорожник	46	0,9	0,5	1,5	0,8

Продолжение табл. 3.3

Растение	Прорастанье семян, % от контроля	Корни, мг контроль	Корни, мг опыт	Побег, мг контроль	Побег, мг опыт
пазник укоренившийся	58	1,6	0,1	2,7	0,7
марь краснокорневая	71	1,5	0,1	5,7	0,1
портулак крупноцветный	67	1	0,1	2,5	0,2
лиродревесник	57	0,9	0,6	5,3	1,7
Марь белая	69	0,2	0,1	0,7	0,4
одуванчик	60	1,9	0,9	2,6	1,2
горлюха щетинистая	62	1,8	1	4,1	2,4
крестовник	96	0,5	0,3	1,8	1,1
чертополох однолетний свиной	58	1	0,6	3,1	1

Указаны концентрации, обеспечивающие 10% всхожесть. Виды, которые не проросли при указанных концентрациях, были посеяны в почву с меньшим содержанием смеси гриба с торфом.

Культуры *Trichoderma* выделяют разнообразные метаболиты, обладающие фитотоксической активностью. Показано, что 6-пентил- α -пирон является ингредиентом запаха персика и продуктом химической промышленности. Установлено, что данное соединение нетоксично для тепличных культур фасоли, кукурузы и табака. Метаболит харзианопиридон *T. harzianum* токсичен по отношению к тепличным культурам в дозе 10^{-2} М. Конингин А и конингин В, синтезируемые *T. koningii*, подавляли этиоляцию колеоптилей пшеницы. Похоже, что конингин В обладает более фитотоксичными свойствами, чем конингин А.

Факторы, влияющие на подавление роста растений

Отрицательные эффекты метаболитов *Trichoderma* на рост растений могут ограничить использование грибов как биоконтрольных агентов. Общее количество и тип инокулята, вносимого в почву, должно выбираться таким образом, чтобы снизить возможный фитотоксичный эффект. Каждый штамм обладает уникальным спектром вторичных метаболитов. Таким образом, отрицательные эффекты на растения можно нивелировать путем селекции штамма. Люмсен (Bailey and Lumsden, 1998) выделил штаммы *T. virens*, продуцирующие высокие концентрации глиотоксина и низкие – виридина, и наоборот. Глиотоксин позитивный штамм GL-21 был использован в теплице для получения рассады.

Условия культивирования оказывают решающее влияние на уровень производства токсинов *T. virens*. Показано, что биомасса *T. virens*, выращенная на рисе, содержала высокие дозы виридиола и подавляла прорастанье семян хлопчатника. Биомасса, выращенная на глюкозно-картофельном агаре, содержала незначительный уровень виридиола и не обладала фитотоксическими свойствами. Синтез глиотоксина, в отличие от виридиона, регулируется рН и соотношением С:N в среде культивирования. При соотношении С:N =150:1 синтез глиотоксина происходит при низких рН (рН<6), а синтез виридиона начинается при нейтральных рН (рН>6).

Существуют подходы, снижающие уровень токсинов и других вторичных метаболитов в штаммах *in vivo*. Фунгициды пропиоконазол и флюсилазол ингибировали цитохром Р450-зависимое С₁₄-деметилирование стиролов. Низкие

концентрации фунгицидов подавляли синтез виридина, но не влияли на рост грибов. Однако фунгициды не влияли на синтез глиотоксина и глиовирин (табл. 3.4).

Т а б л и ц а 3.4

Эффект ингибиторов биосинтеза стиролов на продукцию (мкг/мл) фитотоксина виридиола и других вторичных метаболитов *Trichoderma virens* в культуре

Штамм/ингиб.	виридиол	виридин	глиотоксин	глиовирин
Группа P				
G-4 + UT	1510 ± 100	110 ± 30	-	1560 ± 100
G-4 + PC	0	47 ± 12	-	1430 ± 60
G-8 + UT	1460 ± 100	37 ± 6	-	1680 ± 50
G-8 + PC	0	56 ± 6	-	1460 ± 100
G-9 + UT	1480 ± 90	37 ± 6	-	1730 ± 100
G-9 + PC	0	170 ± 50	-	1560 ± 130
Группа Q				
G-6 + UT	2340 ± 90	30 ± 17	650 ± 100	-
G-6 + FL	0	0	890 ± 150	-
G-11 + UT	2460 ± 20	37 ± 15	700 ± 80	-
G-11 + FL	0	0	950 ± 200	-
G-20 + UT	2350 ± 30	30 ± 10	700 ± 100	-
G-20 + FL	0	0	800 ± 70	-

UT – необработанный контроль, PC – пропиконазол, FL – флюсилазол, концентрации ингибиторов – 1 мкг/мл.

Фунгициды блокировали синтез виридина, что позволило обрабатывать семена хлопчатника более высокими концентрациями инокулята *G. virens*. Таким образом, можно использовать для защиты растений штамм, продуцирующий в норме высокие дозы фитотоксинов, таких, как виридин.

3.4.2. Положительные взаимодействия с растениями и резистентность к патогенам

Для *Trichoderma* известны как положительные, так и отрицательные типы взаимодействия с высшими растениями, выращиваемыми промышленным образом грибами и человеком.

Виды рода *Trichoderma* способны защищать растения от действия патогенов с помощью подавления фитопатогенных микроорганизмов, а также путем индуцирования системной и локальной резистентности растений. Такие прямые эффекты *Trichoderma* на рост и развитие растений очень важны для применения в сельском хозяйстве и для понимания роли грибов *Trichoderma* в природных и искусственных экосистемах.

Штаммы *Trichoderma* способны колонизировать как локальные сайты на корнях, так и все корневые поверхности в случае ризосферокомпетентных штаммов (Harman et al., 2000). Иногда это напоминает морфологический микопаразитизм: гифы проникают через эпидермис корневых клеток (фото 3.4). Проникновение обычно ограничивается первым и вторым слоями клеток. Однако описан эндофитный штамм *T. stromaticum*, обитающий в сосудистой системе растения какао. Инвазия штаммов *Trichoderma* во внешние слои клеток может привести к развитию системной резистентности растений (СРР), и штамм, колонизирующий сосудистую ткань, может быть более эффективным индуктором (Harman et al., 2004).

Влияние колонизации корней на метаболизм растения

В некоторых работах показано, что колонизация корней видами *Trichoderma* приводит к увеличению уровня защитных ферментов растений, в том числе пероксидаз, хитиназ, β -1,3-глюканаз и фермента липоксигеназного пути гидроксипероксид лиазы (Howell et al., 2000). Так, внесение штамма T-203 *T. asperellum* под огурцы приводило к постоянному увеличению синтеза фенилаланин-аммиаклиазы в проростках и корнях, но через 2 дня эффект исчезал. Однако если на листья наносили инокулят патогена *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, экспрессия генов защитных белков продолжалась длительное время.

Изменения метаболизма растения может приводить к аккумуляции антимикробных веществ. Способность *T. virens* индуцировать синтез фитоалексинов и индуцировать локальную резистентность в хлопчатнике является предметом дискуссии. Колонизация корней огурцов штаммом T-203 приводила к увеличению уровня фенолглюкозида в листьях. Агликоны (фенолглюкозиды без одного углеводного остатка) являются сильными ингибиторами разных бактерий и грибов. Накопление ингибиторов наблюдается только в тех растениях, в корневую зону которых инокулировали штамм T-203, и листья которых затем заразили *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Эффект не наблюдался, если какой-нибудь из штаммов вносился в систему один. Эффект не зависел только от штамма T-203. Анализ экстрактов листьев показал, что больше антимикробных веществ накапливалось в тех листьях, на которые наносили инокулят штаммов P1 и T-22. Таким образом, виды *Trichoderma* не только непосредственно выделяют антибиотики, но и стимулируют образование антимикробных соединений в растениях.

Колонизация корней этими грибами, таким образом, вызывает значительные изменения растительного метаболизма.

Улучшение корневой системы и роста растений

Виды *Trichoderma* и другие полезные колонизирующие корни микроорганизмы улучшают рост растений и увеличивают урожайность культур, но долговременное улучшение могут вызывать только ризосферокомпетентные штаммы. В тепличном растениеводстве штамм T-22 *T. harzianum* широко используется для защиты от болезней растений вместо химических фунгицидов, поскольку он безопасен для работников. Эффект биоконтрольного агента сохраняется дольше, чем эффект пестицидов, препарат дешевле пестицидов, препарат, в отличие от пестицидов, улучшал состояние корневой системы растений (Harman et al., 2000).

Улучшение развития корневой системы и ускорение роста

В лабораторных опытах и многочисленных полевых испытаниях штамма T-22 показано, что T-22 улучшал развитие корневой системы у растений кукурузы и у других культур (фото 3.6). Этот эффект сохранялся в течение всей жизни однолетнего растения, а вызвать эффект можно было путем протравливания семян из расчета 1 г биомассы на 1 га. Например, кукурузу выращивали из семян, обработанных T-22 и не обработанных. Несколько месяцев спустя, растения выросли до 2 м. Колонизация корней штаммом T-22 привела к развитию вторичных корней уже на глубине 25-75 см от поверхности почвы. Количество вторичных корней в опыте превышало контрольные показатели в 2 раза. В результате растения были устойчивее к засухе, и, возможно, приобрели устойчивость к уплотнению почвы (Harman et al., 2000). Не только штамм T-22 и другие *Trichoderma* способны улучшать развитие корневой системы кукурузы и тепличных культур, но и другие полезные колонизирующие корни микроорганизмы также улучшают рост и развитие растений. Доказано существование синергизма между микоризными грибами и T-22. Также существует синергизм между ферментами *Trichoderma* и бактериальными антибиотиками (Woo et al., 2002). Более того, смешанная культура нескольких биоконтрольных агентов может быть более эффективна, чем единичный агент.

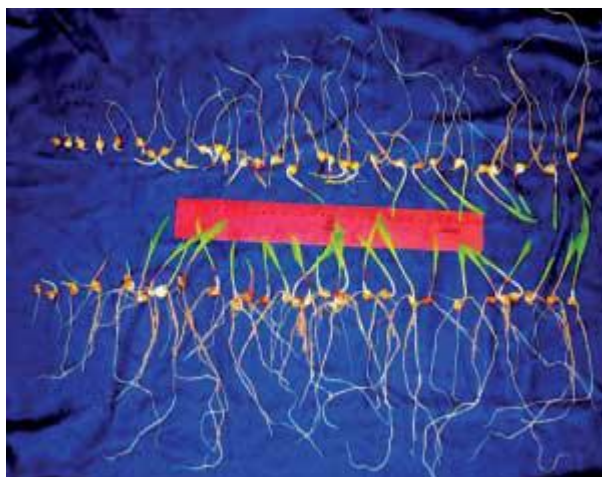


Фото 3.6. Эффект колонизации корней штаммом T-22 *Trichoderma* (фото адаптировано из Harman et al., 2000).

Повышенное развитие корневой системы часто приводит к повышению урожайности и увеличению биомассы растений. Проведено более чем 500 лабораторных и полевых коммерческих испытаний штамма T-22 на кукурузе. Общее увеличение урожайности при использовании в стандартной агрономической практике составило 5%. В процессе опытов часто наблюдали ускорение роста как полевых культур, так и тепличных растений (Harman et al., 2000). Таким образом, применение видов *Trichoderma* может привести к увеличению урожайности культуры, что особенно важно в неблагоприятных условиях. Главным образом, увеличение урожая наблюдается в стрессовых условиях. Когда современные культуры выращивают в неблагоприятных условиях, мало шансов получить высокий урожай. Однако даже в неблагоприятных условиях протравливание семян кукурузы T-22 позволило получать высокие урожаи.

Важно разделять прямые воздействия на рост растений, и контроль патогенов и других вредных микроорганизмов, замедляющих рост растений. Однако при взаимодействии T-22 и растений кукурузы происходило ускорение роста корней и проростков как в стерильной, так и в нестерильной почве, а также в присутствии фунгицидов в почве. Более того, штамм T-203 *T. asperellum* и другие штаммы *Trichoderma* ускоряли рост растений в гидропонной культуре. В большинстве случаев, однако, улучшение развития корней и связанный с этим ускоренный рост растений происходили как в результате биоконтроля патогенов и воздействия полезной ризосферной микрофлоры, так и в результате прямого воздействия грибов на рост растения. Известно, что вредная корневая микрофлора способна снижать скорость роста растений даже в отсутствие заболеваний. Некоторые вредные корневые микроорганизмы выделяют цианид для сохранения своей экологической ниши и для успешной конкуренции. Виды *Trichoderma* устойчивы к цианиду и секретируют два фермента, разрушающих цианид в ризосфере (Ezzi, Lynch, 2005). Таким образом, эти грибы способны прямо увеличивать скорость роста растений путем контроля вредных непатогенных корневых микроорганизмов, разрушать токсичные метаболиты и подавлять рост патогенов. Ускорение роста корней и всего растения под воздействием грибов *Trichoderma*, устойчивость к стрессу достигается разными путями. Каждый из путей включает в себя несколько механизмов, описанных для большинства патогенов корней и листьев.

Влияние *Trichoderma* на потребление питательных веществ растениями

Виды *Trichoderma* увеличивали потребление и концентрацию разнообразных элементов (меди, фосфора, железа, марганца и натрия) корнями растений в

гидропонной культуре даже в неблагоприятных условиях (Yedidia et al., 2001). Увеличение потребления свидетельствует о положительном влиянии *Trichoderma* на интенсивность потребления элементов растениями. Кукуруза реагировала на повышение усвоения азотных удобрений тем, что листья растений становились более зелеными, чем в контроле. Урожайность достигала максимальных показателей и выходила на плато. Значения максимальной урожайности специфичны для каждого генотипа в соответствующих условиях. Однако было показано, что культуры, выращенные из семян, протравленных Т-22, дают максимальные урожаи, хотя под них вносили на 40% меньше азотных удобрений, чем в контроле (Harman et al., 2000). При дополнительной азотной подкормке урожай может превысить значения плато для данной культуры. Результаты показывают, что Т-22 увеличивает эффективность азотного удобрения на кукурузе. Данное обстоятельство позволило сократить нитратное загрязнение почвы и поверхностных вод, что является серьезным побочным отрицательным следствием крупномасштабного производства кукурузы. Как показывают анализы, кроме положительного влияния на усвоение азота, Т-22 значительно увеличивал потребление многих элементов, таких, как мышьяк, кобальт, кадмий, хром, никель, свинец, ванадий, магний, марганец, медь, бор, цинк, алюминий и натрий. В полевых опытах эффект значительно снижался (Harman, 2004).

Наконец, известно, что Т-22 – и, возможно, другие виды *Trichoderma* – способны переводить в растворимые формы различные питательные для растений элементы, такие, как минеральные фосфаты, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} , Zn^0 . Эти элементы часто недоступны в почве для растений. Т-22 снижает содержание окисленных ионов металлов, переводит их в подвижные формы, выделяет сидерофоры, хелатирующие ионы. Исследована способность стимуляции роста растения и биоконтроля гриба *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 (Т-22) путем растворения *in vitro* некоторых нерастворимых или недостаточно растворимых минералов (Altomare et al., 1999). Существует три возможных механизма: подкисление среды, продуцирование хелатных метаболитов и окислительная активность. Т-22 был способен к растворению MnO_2 , металлического цинка и неорганического фосфата (главным образом, фосфата кальция) в жидкой среде, содержащей сахарозно-дрожжевой экстракт. Подкисление не было главным механизмом растворения, так как рН культур никогда не падал ниже 5.0, и в культурах, содержащих MnO_2 , рН повышался от 6.8 до 7.4. Органические кислоты не были обнаружены. Fe_2O_3 , MnO_2 , Zn , и неорганический фосфат были растворены. Эта деятельность может объяснять, по крайней мере, частично, способность Т-22 к увеличению роста растения. Растворение металлической окиси происходит с участием хелатиона и процесса окисления. Оба из этих механизмов также играют роль в биоконтроле патогенных растений при разнообразных состояниях окружающей среды.

Радриш с соавторами (Rudresh et al., 2005) исследовали эффект комбинированной инокуляции *Rhizobium*, фосфат растворяющих *Bacillus megaterium sub sp phosphaticum* и биоконтроль *Trichoderma* в росте, потреблении азота и урожая нута в теплице и в полевых условиях. Комбинированная инокуляция этих трех организмов привела к повышению прорастания, усваивания азота (120 мг/раст.), фосфора (6 мг/раст.), высоты растений, числа ответвлений, образования узелков, урожая, и общей биомассы по сравнению с каждой индивидуальной инокуляцией и не инокулированным контролем.

Выводы о воздействии на рост растений

Для отдельных видов *Trichoderma* показана способность к увеличению роста и массы корней, что приводит к повышению урожайности. Во многих случаях реакции растений являются результатом прямых воздействий на растения, снижения активности вредной корневой микрофлоры, инактивации токсических метаболитов в корневой зоне. Полезные грибы увеличивают потребление питательных элементов и

эффективность усвоения азота, а также солюбилизируют элементы из почвы. Генетическая и молекулярная основа этих эффектов неизвестна. У разных видов и сортов растений наблюдаются отличия в ответных реакциях на воздействие *Trichoderma*, по крайней мере, это показано для кукурузы (Harman, 2003). Недавно показано, что стимуляция роста растений под воздействием бактерий, фенотипически напоминающая ситуацию с *Trichoderma* T-22, связана с тем, что бактерии выделяют летучие вещества, такие, как ацетоин и 2,3-бутанедиол. Молекулярная структура элиситоров, стимулирующих рост растений, *Trichoderma* spp. неизвестна. Колонизация корней также увеличивает скорость роста корней и всего растения, что приводит к повышению продуктивности культуры и урожая репродуктивных органов. Колонизация корней также помогает растению преодолеть абиотические стрессы и увеличивает усвоение питательных элементов.

3.4.3. Индукция резистентности растений

Установлено 3 главных пути развития индуцированной резистентности (ИР) в растениях. В двух путях происходит прямое образование белков, связанных с патогенезом (БП). В одной системе БП образуются в результате атаки патогенными микроорганизмами, во второй – в результате повреждения и некроза тканей, вызванного хищниками и патогенами. Например, раны, нанесенные насекомыми. Но оба пути могут индуцироваться в результате атаки другими организмами. В типичном случае в результате функционирования пути, индуцированного патогеном, образуется салициловая кислота как сигнальная молекула. В результате повреждения ткани растения хищником образуется жасмоновая кислота. Эти вещества и их аналоги при экзогенном нанесении на растение также индуцируют резистентность, кроме того, метаболические пути сигнальных молекул связаны между собой. Терминология, связанная с этими процессами, сомнительная и часто отвечает предпочтениям исследователей. Жасмонатный путь определяют как индуцированную системную резистентность. Этим же термином обозначается совершенно иной процесс, инициируемый ризобактериями. Жасмонатный и салицилатный пути характеризуются синтезом каскада БП (Segarra et al., 2006). Это микотоксичные хитиназы, глюканазы и траматины, окислительные ферменты, такие, как пероксидазы, полифенолоксидазы и липоксигеназы. В тканях растений накапливают низкомолекулярные антимикробные вещества (фитоалексины). Триггерные молекулы, образующиеся в ответ на воздействие *Trichoderma*, неизвестны. В данной главе мы приводим пример системной приобретенной резистентности (СПР), развивающейся в результате накопления БП и фитоалексинов. Третий тип ИР описан для случая невирулентных ризосферных бактерий, как РСРР (ризобактериальная системная резистентность растений). Фенотип РСРР напоминает жасмонатный путь, однако процессы, приводящие к СРР, различны. В отсутствие атаки патогенов колонизация корней ризобактериями не приводит к аккумуляции в тканях растений БП и фитоалексинов. При атаке патогенов растения реагируют более активно, и болезнь подавляется. Так, ризобактерии стимулируют защитные реакции растений в отсутствие каскада ферментов, характерных для жасмонатного и салицилатного пути ИР.

Индукция резистентности растений элиситорами *Trichoderma*

Данные, приведенные выше, позволяют нам формулировать модельные механизмы, посредством которых виды *Trichoderma* контролируют или снижают заболеваемость растений. Различные штаммы *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* вызывают изменения метаболизма растений и увеличивают резистентность растений к широкому набору фитопатогенных микроорганизмов и

вирусов. Более того, защитные ответы этого типа широко распространены и эффективны для многих растений. Так, штамм T-22 индуцировал устойчивость многих растений от томатов до кукурузы (табл. 3.5), что говорит об отсутствии специфичности растений в отношении защитного механизма. Когда споры или другие пропатулы вносят в почву, где они контактируют с корнями растений, они прорастают и растут на поверхности корней и чаще всего инфицируют внешние клеточные слои. Виды *Trichoderma* образуют 3 типа элиситоров защитных механизмов растений, которые предотвращают заражение корней фитопатогенами. Элиситорами являются пептиды, белки и низкомолекулярные вещества. В некоторых случаях развивается локальная резистентность, как в случае *T. virens* на хлопчатнике. Но в большинстве ассоциаций растений с видами *Trichoderma* развивается системная резистентность. Через короткий период времени происходит экспрессия генов, кодирующих защитные механизмы, по всему растению. Этот эффект может быть проходящим, но патоген сразу инициирует экспрессию защитного механизма в органах, удаленных от сайта обитания биоконтрольного штамма *Trichoderma*. Результаты показывают, что начальные реакции защитного механизма напоминают СПР. В случае взаимодействия *T. asperellum* и растений огурца до атаки фитопатогена наблюдали невысокий уровень защитных белков в растениях. Подобная ситуация наблюдалась в случае ризобактериальной СПР. Виды *Trichoderma* прямо атакуют другие грибы, выделяют антибиотики и непосредственно убивают или предотвращают развитие патогенных грибов при помощи всех этих механизмов.

Индуцированная ризобактериями СПР фенотипически напоминает СПР. Однако, в отличие от ситуации при СПР, колонизация корней ризобактериями не приводит к экспрессии белков, характерных для патогенеза, и колонизация корней некоторыми бактериями также не приводит к индукции и аккумуляции салициловой кислоты в растении. Вместо этого, растения подготавливаются для того, чтобы быстро реагировать на атаку патогенов. В растении *Arabidopsis* СПР, индуцированная ризобактериями, приводит к повышению чувствительности к жасмоновой кислоте и этилену, и как в случае СПР, зависит от фактора транскрипции NPR 1.

Индукция СПР видами *Trichoderma* изучена недостаточно по сравнению с ризобактериальной СПР, поскольку в случае *Trichoderma* основное внимание ученых уделялось прямым воздействиям на другие грибы, особенно микопаразитизму и антибиозу. Возможно, что работа Биграймана с соавторами, опубликованная в 1997 году (цит. по Harman et al., 2004), была первой работой, в которой было приведено документальное свидетельство СПР, индуцированной *Trichoderma*. Авторы показали, что внесение в почву под бобы штамма T-39 *T. harzianum* приводило к тому, что листья бобов были устойчивы к таким патогенам, как *B. cinerea* и *Colletotrichum lindemuthianum*, хотя штамм T-39 присутствовал на корнях, но не листьях растений. Эта же группа авторов изучала СПР к *B. cinerea* у других двудольных растений. Похожие испытания проведены на значительном спектре однодольных и двудольных растений с использованием различных видов и штаммов рода *Trichoderma* (табл. 3.5). Способность штамма T-22 *T. harzianum* индуцировать СПР у растений кукурузы против различных патогенов не вызывает сомнений. Однако нет пока похожих данных о способности микроорганизмов комменсалов или симбионтов растений, обитающих на корнях, индуцировать СПР на других культурах. Таким образом, способность индуцировать СПР против широкого спектра патогенов (грибов, бактерий и вирусов) у разных растений, по-видимому, присуща всем представителям рода *Trichoderma* (табл. 3.5). Однако остается еще много неясного в механизмах индукции.

Большинство примеров СПР в таблице 3.5 показывает, что это именно системная устойчивость, поскольку все штаммы *Trichoderma* присутствуют только на корнях, но не на листьях. Труднее изучать примеры индукции устойчивости к патогенам, которые вызывают заболевания корней или семян, особенно в тех случаях, когда

биоконтрольный агент и патоген локализованы в одном и том же сайте. Однако установлено, что штаммы *T. virens* различались по способности синтезировать антибиотики или являться микопаразитами (Howell et al., 2000). Мутантные и дикие штаммы были проверены на способность контролировать заболевания саженцев хлопчатника, которые вызывает *Rhizoctonia solani*. Однако ни способность синтезировать антибиотики, ни микопаразитизм не были тесно связаны с эффективностью биоконтроля. А вот способность штаммов индуцировать синтез терпеноидов фитоалексинов в растении строго коррелировала с активностью биоконтроля.

Прямые воздействия на фитопатогены являются только одним из механизмов биоконтроля и, возможно, являются менее важными, чем индукция СРР. В этом случае штаммы *T. virens*, похоже, индуцировали скорее локальную, чем системную резистентность (Howell, 2003). Однако большинство других штаммов, указанных в таблице 3.5, индуцировали СРР разных культур. Интересным является тот факт, что индуцированная резистентность – по крайней мере, в случае ризосферокомпетентного штамма Т-22 – обеспечивала защиту тех органов растений, которые как во времени, так и в пространстве, были удалены от места введения биоконтрольного агента. В полевых испытаниях на томатах показано, что инфекция листьев, вызываемая *Alternaria solani*, подавлялась на 100 дней раньше в случае колонизации корней штаммом Т-22 (рис. 3.7). Все еще неизвестно, как долго сохраняется СРР в отсутствие индуцирующего штамма *Trichoderma*. Однако известно, что если ризосферокомпетентный штамм развивается вместе с растением, то эффект СРР может сохраняться в течение длительного времени.

Т а б л и ц а 3.5

Свидетельство о роли видов *Trichoderma* в индукции СРР растений и об эффективности резистентности

Виды и штаммы	Растение	Патогены	Проявления эффекта	Время после применения	Эффективность
<i>T. virens</i> G-6, G-5, G-11	Хлопчат-ник	<i>Rhizoctonia solani</i>	Защита растения, синтез микотоксичных терпеноидов и фитоалексинов	4 дня	Снижение заболеваемости на 78%, способность к синтезу фитоалексинов, важных для биоконтроля
<i>T. harzianum</i> T-39	Бобы	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Botrydis cinerea</i>	Защита листьев, когда T-39 только на корнях	10 дней	Снижение болезней листьев на 42%
<i>T. harzianum</i> T-39	Томаты Перец, табак Лук, бобы	<i>Botrydis cinerea</i>	Защита листьев, когда T-39 только на корнях	7 дней	Снижение симптомов серой гнили на 25-100%
<i>T. asperellum</i> T-203	Огурцы	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lactriymans</i>	Защита листьев, когда T-203 только на корнях, синтез антигрибных веществ в листьях	5 дней	Снижение болезней листьев на 80%, нет бактерий на листьях
<i>T. harzianum</i> T-22, <i>T. atroviride</i> P1	Бобы	<i>Botrydis cinerea</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	Защита листьев, когда T-22 и P1 только на корнях, синтез антигрибных веществ в листьях	7-10 дней	Снижение симптомов серой гнили на 69%, снижение симптомов бактериального заболевания на 54%
<i>T. harzianum</i> T-1 и T-22 <i>T. virens</i> T3	Огурцы	Вирус зеленой мозаики	Защита листьев, когда <i>Trichoderma</i> только на корнях	7 дней	Снижение болезни, ускорение роста
<i>T. harzianum</i> T-22,	Томаты	<i>Alternaria solani</i>	Защита листьев, когда T-22 только на корнях	3 месяца	Снижение на 80% симптомов болезни на инфицированном ранее поле
<i>T. harzianum</i> T-22	Кукуруза	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Защита листьев, когда <i>Trichoderma</i> только на корнях	14 дней	Снижение на 44% площади ран на больных листьях и отсутствие болезни на здоровых листьях
<i>Trichoderma</i> GT3-2	Огурцы	<i>Colletotrichum orbiculare</i> <i>P. syringae</i> Pv. <i>lactrymans</i>	Защита листьев когда <i>Trichoderma</i> только на корнях Индукция синтеза лигнина и супероксида	1 день	Снижение болезней на 59% и на 52% соответственно
<i>T. harzianum</i>	Перец	<i>Phytophthora capsici</i>	Защита стеблей, когда <i>Trichoderma</i> присутствует только на корнях	9 дней	На 40% снижение длины поражения
<i>T. harzianum</i> NF-9	Рис	<i>Magnapotha grisea</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	Защита листьев, когда <i>Trichoderma</i> только на корнях	14 дней	Снижение болезни на 34-50%

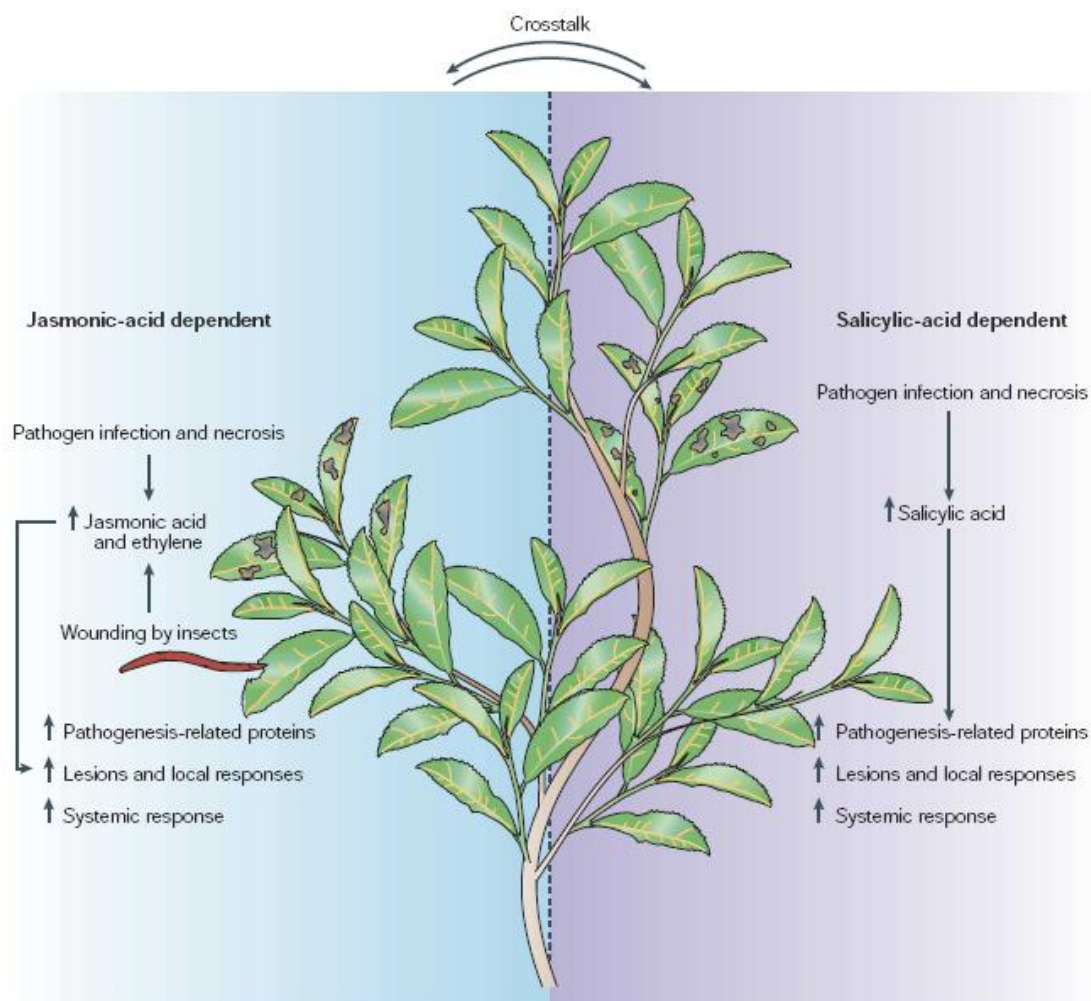


Рис. 3.7. Модель индуцированной резистентности (ИР) у томатов (рис. адаптирован из Harman, 2004).

Так, данные показывают, что индуцированная локальная и системная резистентность является важным компонентом биоконтроля заболеваний растений штаммами *Trichoderma*. Однако у разных штаммов биоконтрольная активность может определяться различными механизмами, растениями и патогенами. Например, точечная мутация у *T. atroviride* P1 приводила к отсутствию активности эндохитиназы, что снижало эффективность биоконтроля против *B. cinerea* при нанесении конидий P1 на листья, что свидетельствовало о том, что микопаразитизм важен для защиты от данного патогена. Напротив, тот же мутантный штамм обладал высокой биоконтрольной активностью против *R. solani*, чем родительский штамм (Harman et al., 2004).

Активация ответной реакции с помощью элиситоров могла быть ценной стратегией – альтернатива для использования трансгенных растений против патогенов. Добавление ламинарина, β -1,3-глюкана к виноградным лозам индуцировало несколько генов защиты и уменьшило инфекцию *B. cinerea* и *Plasmopara viticola* (Arst, Peñalva, 2003). *Phytophthora parasitica* производит гликопротеид клеточной стенки (CBEL), имеет целлюлозосвязывающий домен (CBD) и вызывает защитные реакции в растении хозяина. Проникновение CBEL не в растение-хозяина также приводит к появлению защитных реакций. Экспрессия у растений хитиназ грибов, например, Chit42, которая уже увеличила противогрибковую деятельность (Limón et al., 2004), может привести к большей устойчивости к фитопатогену. Это представляет интерес для исследования эффекта добавления растениям хитиназ или глюканаз, произведенных *Trichoderma* с целью продления действия защитных механизмов. По данным некоторых авторов,

сопротивление растений в присутствии *Trichoderma* сохранилось в течение долгого времени, по крайней мере, несколько месяцев. Подобный эффект мог иметь место после добавления элиситоров *Trichoderma*, которые являются особенно важными в защите фруктов против инфекций после сбора урожая (Benítez et al., 2004).

Биохимические элиситоры устойчивости к заболеваниям

Известно, что штаммы *Trichoderma* образуют 3 типа веществ, которые индуцируют резистентность растений. Это белки с ферментативной активностью или с какой-нибудь другой активностью, продукты генов Avt (антивирулентные белки), олигосахариды и низкомолекулярные вещества, которые выделяются из клеточных стенок грибов и растений в результате воздействия на них ферментов *Trichoderma*.

Даже до того, как было установлено, что штаммы *Trichoderma* способны индуцировать резистентность растений, было известно, что ксиланаза 22 kDa, которую секретируют многие виды, индуцирует синтез этилена и защитные реакции растений. Интересно, что этот небольшой белок быстро переносится в сосудистой системе растения табака при введении через разрез листового черенка. Белок индуцировал локальную резистентность и некроз, для развития СРР белок должен распространиться по всему растению.

Недавно установлено, что штамм *T. virens* выделял серию белков и пептидов, которые индуцировали биосинтез терпеноидных фитоалексинов и пероксидазы в растениях хлопчатника. Показано, что 6 белков и пептидов обладали элиситорной активностью. Один из них обладал кросс-иммунореактивностью к ксиланазе, индуцирующей синтез этилена в растениях, а другой размером 18 kDa в области NH₂ конца был гомологичен сериновой протеиназе *Fusarium sporotrichioides* (Harman et al., 2004).

Продукты Avt генов

Белковые продукты Avt генов идентифицированы у большого количества фитопатогенных грибов и бактерий. Они расоспецифичные и индуцируют гиперчувствительность или другие защитные реакции в культурах растений, которые содержали соответствующие гены резистентности. С помощью протеомного анализа штамма T-22 идентифицированы белки, гомологичные Avt4 и Avt9 *Cladosporium fulvum*. Штамм P1 *T. atroviride* также образовывал подобные белки, олигосахариды и низкомолекулярные соединения. Получены мутанты *Trichoderma*, экспрессирующие сигнальные системы, такие, как зеленый флюоресцентный белок или глюкозооксидаза под контролем промоторов, ассоциированных с биоконтролем. Это позволило выделить и охарактеризовать биологически активные молекулы, которые освобождаются из клеточных стенок фитопатогенных грибов или из растений под воздействием гидролаз *Trichoderma*. Эти молекулы, образующиеся в результате многообразных взаимодействий *Trichoderma* с патогенными грибами и с корнями растений в природе, действуют как индукторы экспрессии антагонистического каскада генов *Trichoderma* и как элиситоры защитных механизмов растений (Kubicek et al., 2001).

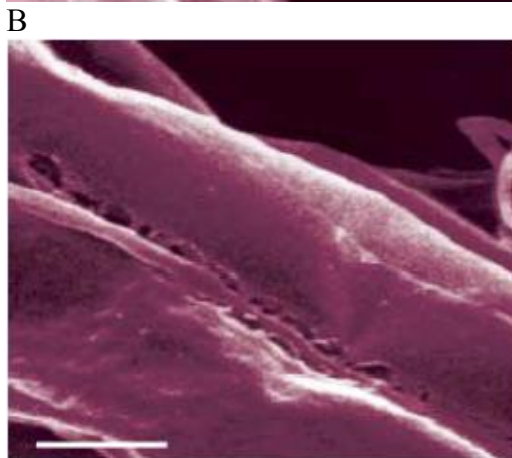
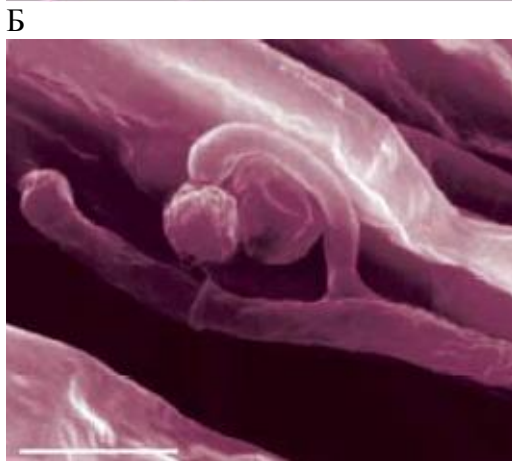
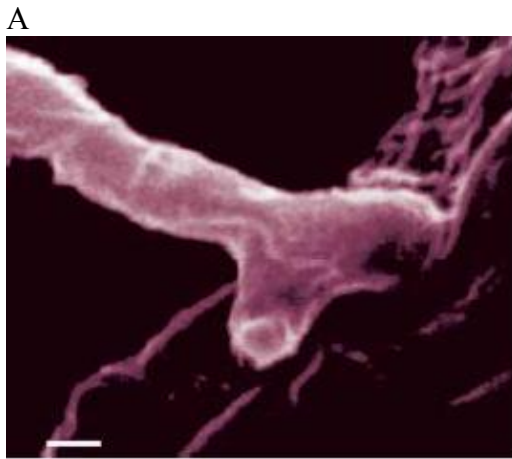


Фото 3.8. Взаимодействие *Trichoderma asperellum* T-203 с корнями огурца.

А) аппресория-подобная структура;

Б) образование «катушки» – наматывание на корневой волосок. Подобная картина наблюдается при взаимодействии с другими грибами;

В) *T. asperellum* также проникает в кортикальные клетки корня, но ограничивается;

Г) корни огурца реагируют на инфекцию утолщением клеточной стенки (W), которую гифы T-203 (T), находящиеся в интрацеллюлярном пространстве (IS), безуспешно пытаются пройти. Возросшая электронная плотность и осмофильная природа стенки клетки-хозяина указывает на продукцию фенольных компонентов в ответ на T-203, которые хорошо окрашиваются в реакции с О-гидроксигруппами.

Глава 4. Промышленное применение *Trichoderma*

Сокращения:

ЭПР	эндоплазматический ретикулум;
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс;
КРС	крупный рогатый скот;
CBD	целлюлоза-связывающий домен;
PDI	белок дисульфид-изомеразы;
MAR	районы присоединения матрикса;
МЭК	мультиэнзимные композиции;
РТ	Республика Татарстан;
T	<i>Trichoderma</i> ;
ОСВ	осадки сточных вод;
ПДК	Предельно допустимая концентрация.

4.1. Промышленное применение ферментов *Trichoderma*

4.1.1. Применение целлюлаз *Trichoderma*

Целлюлазы после детергентов и крахмала, стали третьим по размерам и одним из самых быстрорастущих рынков промышленных ферментов (Ahmed et al., 2005). Целлюлазы и гемицеллюлазы составляют 20% мирового рынка ферментов, и значительная часть этого рынка – ферменты *Trichoderma*.

Целлюлазы *Trichoderma* впервые были использованы в сельском хозяйстве в производстве кормов и в пищевой промышленности. Ферменты применяли для снижения вязкости и улучшения фильтрации солода при производстве алкогольных напитков, для мацерации растительного материала, чтобы легче было извлекать ароматические вещества, в производстве соков для размягчения овощей и фруктов, содержащих растительные волокна, а также в виноделии и в производстве оливкового масла. Кроме того, *Trichoderma* применяют в процессе приготовления углеводсодержащего желирующего концентрата для кондитерских изделий (Квасенков, Шаззо, 2001). Целлюлазы и гемицеллюлазы *T. reesei* используются в текстильной, бумажной промышленности и при производстве моющих средств (Stricker et al., 2006). Во всех случаях целью использования фермента является модификация целлюлозных волокон, поэтому современные ферменты на рынке являются продуктами генетически модифицированных штаммов, которые синтезируют желаемую смесь фермента (Galante et al., 1998).

Биоконверсия целлюлозы для энергетических целей не имеет широкого практического применения из-за медленной кинетики деградации кристаллической формы целлюлозы (Mäntylä et al., 1998).

Промышленные мутанты и рекомбинантные штаммы *T. reesei*

А. Мутанты *T. reesei*. *T. reesei* является важным промышленным грибом, продуцирующим большое количество как белков, так и ферментов деградации (Dienera et al., 2004).

Интерес к *T. reesei* возник в течение нефтяного кризиса 70-х годов. Идея производства этанола из лигноцеллюлозных материалов для обеспечения альтернативной системы получения энергии актуальна и сегодня (Sun, Cheng, 2005). Однако высокая стоимость производства фермента, низкая производительность доступных микробных штаммов не позволяли их использовать в промышленном

масштабе. Началось улучшение штаммов с помощью классических генетических методов селекции, таких, как мутация и скрининг: для (1) увеличения продукции фермента с помощью суперпродуцентов *T. reesei*, (2) выделения мутантов, устойчивых к катаболитной репрессии, (3) выделения мутантов, устойчивых к ингибированию конечным продуктом, (4) выделения конститутивных мутантов, которые могли бы использовать недорогие источники азота и углерода без снижения продукции ферментов, (5) для выделения мутантов с повышенным производством β -глюкозидазы (Mäntylä et al., 1998).

Успешный мутагенез, скрининг микромицетов в академических и промышленных лабораториях привёл к производству штаммов *T. reesei* для промышленного производства (Kovacs et al., 2006). Специфический штамм *T. reesei* QM6a известен как родительский штамм многих современных суперпродуцентов целлюлаз. В начале 70-х Манделъс (цит. по Mäntylä et al., 1998) выделил штамм QM9414. Дальнейший мутагенез этого штамма позволил получить серии суперпродуцентов-мутантов в различных лабораториях. Для получения высокоэффективных мутантов *T. reesei* были использованы химические мутагены, УФ, рентген. Для скрининга мутантов суперпродуцентов целлюлазного комплекса в качестве субстрата чаще всего использовали обработанную фосфорной кислотой Волсет-целлюлозу. При замене данной среды карбоксиметил-целлюлозой были получены суперпродуценты эндоглюканазы. Мутанты по β -глюкозидазе можно определять с помощью различных чашечных тестов. Например, с помощью 4-метил-умбеллиферил- β -D-глюкозида, *p*-нитрофенил- β -D-глюкозида, 5-бromo-4-хлоро-3-эндолил- β -D-глюкозида, используемых в качестве субстрата (Mäntylä et al., 1998).

Мутанты, устойчивые к катаболитной репрессии, были получены путём добавления в среду высоких доз (5% или более) катаболитного репрессора, такого как глюкоза или глицерин в комбинации со специфическим целлюлозным субстратом. Для селекции устойчивых к катаболитной репрессии мутантов чаще всего использовали антиметаболит 2-деоксиглюкозу в концентрации 0,5% в качестве катаболитного репрессора (Mäntylä et al., 1998).

Мутанты, устойчивые к ингибированию конечным продуктом, получены путём добавления высоких доз конечного продукта в селективную систему скрининга. Конститутивные мутанты можно выделить путем посева выживших после обработки мутагеном культур на солевой агар, содержащий источник углерода (глюкозу или сахарозу), который не является индуктором. По мере роста культуры пересеваются на селективные среды.

Показано, что некоторые мутанты по морфологии значительно отличаются от родительского штамма. Самым значительным описанным отличием является более высокая степень ветвления гифов мутантных штаммов. Ветвящиеся мутанты продуцировали β -глюкозидазу в 2 или 3 раза больше, чем родительский штамм QM9414. В случае Rut-C30 увеличение гиперпродукции целлюлаз коррелировало с увеличением ЭПР, в каналах которого и происходит секреция целлюлаз (Mäntylä et al., 1998).

При производстве технических ферментов и белков процесс секреции в культуральную жидкость и масштаб этой секреции являются важными факторами. Мутантные штаммы *T. reesei* секретируют в культуральную жидкость значительное количество – 40 г фермента/л в оптимизированных условиях. Необходима система эффективной экспрессии гена для производства значительных количеств белков и стабильность рекомбинантных штаммов (цит. по Galante et al., 1998). Штамм *T. virens*, модифицированный геном устойчивости к гигромицину, стабильно сохранял трансген, экспрессировал устойчивость к антибиотику и обладал способностью деградировать фосфорорганические антибиотики (Mark et al., 2005).

Сравнение выхода ферментов и продуктивности, различных целлюлолитических

штаммов затруднено, поскольку штаммы культивируют на различных субстратах и в разных условиях. Для оценки продуктивности использовали детекцию активности разных ферментов. Содержание индивидуальных ферментов в целлюлазном комплексе может варьировать у разных суперпродуцентов. Установлено, что в составе целлюлазного комплекса мутантов Rut-NJ14, Rut-C30 дозы целлобиогидролаз оставались постоянными, так же сообщалось о возможности увеличения индивидуального компонента целлюлазного комплекса эндоглюканазы. (Mäntylä et al., 1998). Получен мутант гриба *T. aureoviride* 7-121, обладающий повышенной секрецией внеклеточных целлюлазы и β -глюкозидазы (целлобиазы). Продукция целлобиазы была выше (5 U/ml) по сравнению с другими штаммами–продуцентами *Trichoderma*. К тому же, мутант показал повышенную продукцию ферментов, деградирующих клеточную стенку: хитиназы, β -1,3-глюканазы, и протеазы (Zaldívar et al., 2001).

Б. Промышленные рекомбинантные штаммы *T. reesei*. Использование метода случайного мутагенеза часто приводит к получению штаммов, в которых улучшена продукция всех ферментов целлюлазного комплекса (Ward, 2006). Использование клонированных генов *T. reesei*, их промоторов, выделенных с помощью RTPCR (Ahmed et al., 2005), новых штаммов с полностью отличными целлюлазными профилями позволяет конструировать штаммы, продуцирующие один или два целлюлазных компонента. Разработка методов использования рибосомной ДНК позволяет использовать эти грибы как для суперпродукции эндогенных белков, так и белков иных грибов, а также белков и негрибных организмов (Mäntylä et al., 1998).

Марко и Феликс предлагают возможность создания трансгенных штаммов *T. harzianum*, секретирующих повышенные количества хитиназ, липаз, гликозидаз и протеаз необходимых для микопаразитизма на фитопатогенах.

Экспрессионные векторы. Используемые экспрессионные векторы содержат последовательности, необходимые для репликации и селекции генома *Escherichia coli*. Селекционный маркер, необходимый для селекции трансформантов, может быть включен в экспрессионный вектор, который будет экспрессироваться только в успешных трансформантах *T. reesei*. Предпочтительнее использовать доминантные селекционные маркеры при производстве промышленных штаммов, поскольку они позволяют отсеять ауксотрофный мутант. В качестве доминантного селекционного маркера для *T. reesei* использовали ген ацетомидазы *Aspergillus nidulans*, который обеспечивает способность утилизировать ацетамид как единственный источник азота. Успешно используются маркеры, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, такие как флеомицин, гидромицин В. Для трансформации ауксотрофных мутантов *T. reesei* использовались векторы *argB A. nidulans*, *trpC A. nidulans*, *pyr4 Neurospora crassa*, *pyrA A. niger* и гомологичный *pyr4 T. reesei* (Mäntylä et al., 1998).

Кроме селективного маркера кассета содержит промотор, транскрипционные регуляторные последовательности и последовательность, кодирующую сигнальный пептид секреции, фермент кДНК и последовательности, необходимые для терминации и сплайсинга мРНК. Фланкирующие последовательности экспрессионной кассеты необходимы для взаимодействия кассеты со специфическим локусом. Экспрессионная кассета используется для трансформации *T. reesei* в качестве линейной ДНК для того, чтобы не допустить встраивание нежелательной ДНК в геном гриба. В случае инактивации и делеции целевого гена используется похожая конструкция, только селекционный маркер помещается между фланкирующими элементами (Mäntylä et al., 1998).

Промотор и терминаторные последовательности. При производстве промышленных ферментов желательно, чтобы процесс был сопряжен с минимальными потерями, поэтому предпочтительнее, чтобы нужный белок выделялся в среды культивирования как главный компонент. Важно осуществлять контроль активности

промотора для оптимального синтеза рекомбинантного белка. Для этого необходим экспрессионный вектор со стабильным регулируемым промотором, такой, как промотор, гомологичный *cbh1*. Использование устойчивого промотора, который обеспечивает большое количество мРНК, может компенсировать потери, связанные с нестабильностью мРНК, низкой эффективностью трансляции или с нестабильностью конечного продукта. Использование промоторов, активных в глюкозосодержащих средах может предоставить возможность получения желаемого фермента без других гидролаз. Для этого используют изолированные гены *T. reesei*, активные в присутствии глюкозы. 3'-нетранслируемый район (терминатор) гомологичного гена обычно помещают после кДНК белка для процессинга мРНК. Терминаторные последовательности могут так же оказывать влияние на стабильность мРНК (Mäntylä et al., 1998).

Сигнал секреции. Сигнальной последовательностью секреции называется короткая аминокислотная лидерная последовательность, присутствующая в составе секреторируемых белков и направляющая транспорт нового белка через мембрану ЭПР. Сигнальный пептид протеолитически отщепляется от белка в процессе транслокации. Сигнальные пептиды плесневых грибов гомологичны таковым у высших прокариот. Несмотря на то, что информация об эффекте различных пептидов такого типа на экспрессию белков и секрецию белков у плесневых грибов ограничена, установлено, что гетерологичные сигнальные последовательности химозина быка, эндопептидазы В из ячменя распознаются *T. reesei*. Суперпродуценты амилазы *T. reesei* были получены с помощью экспрессионных векторов, которые содержали ген глюкоамилазы *Hormoconis resiniae* с N-терминальной последовательностью гена *cbh1* и с кодоном, кодирующим первую аминокислоту *cbh1*. Условия экспрессии были стандартизированы путём переноса одной копии экспрессионной кассеты с геном глюкоамилазы в локус гена *cbh1* хозяина. Данный опыт показывает, что структура самого белка может оказывать влияние на уровень секреции у плесневых грибов (Mäntylä et al., 1998).

Для экспрессии нужного белка можно использовать кДНК и геномную ДНК. Интрон оказывал положительный эффект на экспрессию гена глюкоамилазы *Hormoconis resiniae* в клетках *T. reesei*. Трансформант, в котором локус *cbh1* был заменён одной копией геномной глюкоамилазой, секретировал более активно глюкоамилазу, чем трансформант, содержащий 3 копии кДНК в тандемной ориентации в локусе *cbh1* (Mäntylä et al., 1998).

Похожие результаты были получены в случае лакказы. Описана экспрессия кДНК и геномного гена лакказы *Phlebia radiate* в клетках *T. reesei*. Установлено, что количество мРНК лакказы в трансформантах содержащих ген, но не кДНК было повышено. Данные результаты показывают, что структура геномной ДНК обеспечивает высокий выход фермента. Гены грибов, как и высших эукариот, могут содержать последовательность регуляции транскрипции в составе интронов. Данные обстоятельства могут быть причиной более высокой стабильности и эффективности трансляции мРНК (Mäntylä et al., 1998).

Целевая интеграция. Стабильные трансформанты *T. reesei* могут быть получены путём совместной интегративной рекомбинации трансформирующей ДНК. Стабильность промышленных штаммов является важным фактором, так как потеря векторной ДНК может привести к снижению продуктивности. Необходимо выделить индивидуальные трансформанты путём пересева на селективные среды. Данный подход успешен и позволил получить 100% митотическую стабильность *argB* трансформантов (Mäntylä et al., 1998).

Частота гомологической интеграции кольцевых векторов ДНК в клетках *T. reesei* низкая, варьируется в зависимости от локуса мишени. Если необходима целевая интеграция трансформирующей ДНК, как в случае инактивации гена или замены, более предпочтительной является трансформация линейной ДНК. Для всех главных

целлюлозных локусов *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* получена высокая частота замены 32-84% в тех случаях, когда маркерный ген был фланкирован с 5' и 3' конца последовательностями размером 1кб. Значительное снижение частоты интеграции наблюдалось в случае использования кассеты, содержащей более короткие фланкирующие сиквенсы (Mäntylä et al., 1998).

Изменение профиля продукции с помощью замены гена. Возможность инактивировать или вырезать гены, кодирующие главные секретлируемые белки, очень важна для конструирования штаммов суперпродуцентов гомологичных или гетерологичных белков. Для приготовления полезной смеси фермента для различного использования успешным является одноэтапная замена гена. Гены, кодирующие ферменты, оказывающие отрицательный или нежелательный эффект на качество продукта, могут быть заменены на гены, кодирующие ферменты с желаемыми активностями. Использование таких штаммов приводит к улучшению качества продукта. Например, штаммы секретирующие повышенные количества β -глюканазы и низкие количества целлюлогидролаз являются более эффективными ферментными смесями для производства кормов, чем классические штаммы. Более того, если продукт будет содержать только β -глюконазу вместо СВН1 в количестве не менее 50%, стоимость производства снизится (Mäntylä et al., 1998).

Гены главного целлюлозного комплекса, их промотеры были заменены маркерным геном. Такой штамм может быть получен для промышленного использования. Установлены некоторые эффекты экспрессии генов других целлюлаз с использованием метода ELISA. Делеция гена *cbh1* (кодирующего главную целлюлазу) приводит к двукратному увеличению продукции *cbh2*. Однако замена гена *cbh2* не влияет на уровень целлюлаз, а делеция генов *egl1*, *egl2* приводит к слабому увеличению продукции обеих *cbh* (Mäntylä et al., 1998).

Использование промотера *cbh1* для высокоэффективной продукции белков *Trichoderma*

Эффект замены промотера. Определение гена мишени представляет возможность оценить эффект замены промотера на экспрессию гомологичного гена, чтобы исключить потенциальную вариабельность экспрессии, вызванную локализацией кассеты генома. Около 50% всех секретлируемых целлюлаз представлены СВН1, продуктом одного гена *cbh1*. По-видимому, ген *cbh1* содержит устойчивый регулируемый промотер. Кроме того, промотер *cbh1* индуцируется целлюлозой и олигосахаридами, такими как целлюбиоза, лактоза и софороза. Строго индуцибельный промотер *cbh1* использован для экспрессии как гомологичных белков, так и гетерологичных белков не грибного происхождения (Mäntylä et al., 1998).

У высокопроизводительных рекомбинантных штаммов активность целлюбиогидролаз выключена для того, что бы обеспечить продукцию желаемого белка, количество которого составляет 80-90% от всего секретлируемого белка, и только минимальные количества других белков секретируются в среду. Выключение нежелательного гена может быть проведено с помощью обычных генетических методов, что показано для штамма-продуцента маннаназы (Mäntylä et al., 1998).

Эффект количества копий гена и сайта интеграции. Увеличение количества копий гена усиливает продукцию необходимого белка, хотя взаимосвязь между количеством копий экспрессии генов не всегда пропорциональна. Это можно объяснить количеством факторов транскрипции. Только трех дополнительных копий устойчивого *cbh1* промотера может быть достаточно для достижения концентрации регуляторных белков или других важных факторов транскрипции. Для плесневых грибов установлено, что геномный сайт интеграции интродуцированных генов может оказывать усиливающий эффект на уровень экспрессии. Трансформированная ДНК должна быть помещена в локус с заведомо известной высокой активностью транскрипции. Считается, что локус *cbh1* *T. reesei* обладает самой высокой

транскрипционной активностью и используется для экспрессии различных генов. Сообщается о том, что секреция гомологичных белков, интегрированных в *cbh* локус, выше, чем интегрированных в иной локус (Mäntylä et al., 1998).

Для предсказания эффекта сайта интеграции на экспрессию ген может быть интродуцирован в составе вектора, обеспечивающего высокую эффективность транскрипции независимо от позиции. Несколькими исследованиями показано, что MAR-фрагменты, фланкирующие всю конструкцию, могут минимизировать, снижать позиционный эффект трансформации. MAR-фрагменты, выделенные из генома *T. reesei* в составе плазмид, увеличивали частоту трансформации *T. reesei* примерно в 5 раз (цит. по Mäntylä et al., 1998).

Промышленные штаммы с низкой активностью протеаз. Внеклеточные протеазы секретируются многими грибами, что оказывает отрицательное действие, особенно на гетерологические белки. Количество протеаз может быть снижено путём изменения условий культивирования или путём использования протеадефицитных штаммов. При выделении основной протеазы *T. reesei* QM9414 показано, что она принадлежит к классу нечувствительных к нистатину аспаргатных протеаз. Аспаргатная протеаза *T. reesei* VTT-D-79125, чувствительная к пестатину А – триходермапепсин – выделена и кристаллизована. Удаление гена триходермапепсина из *T. reesei* VTT-D-79125 привело к 94%-ному уменьшению активности кислотной протеазы, на том же уровне, что и сниженная протеаза мутанта ALKO2221, полученная под влиянием ультрафиолета из штамма VTT-D-79125. Удаление гена триходермапепсина из ALKO2221 имело лишь незначительный эффект на оставшуюся протеолитическую активность (Mäntylä et al., 1998).

Кислотные протеазы разрушают не только гетерологические белки, но также нативные структуры ферментов *Trichoderma*. Особенно протеолиз проявляется для СВНІ и СВНІІ, и в меньшей степени для β-глюкозидазы. Разрушение СВНІ начинается с отделения АВ-домена, в то время как СВНІІ подвергается атаке одновременно с двух концов. Разрушение триходермопепсин-кодирующего гена уменьшило количество бесхвостых форм белка СВНІ в культуральных средах (Mäntylä et al., 1998).

Оптимизация условий роста. Каждый новый произведенный штамм нуждается в некоторой среде и в оптимизации ферментных условий для достижения максимальных урожаев (Kredics et al., 2003; Weber, Agblevor, 2005). Начальный скрининг уровней производства трансформантов обычно представлен в относительно небольшом объеме культуры во флаконе. Значительные улучшения могут быть достигнуты увеличением грибной биомассы и контролем различных лимитирующих факторов роста в биореакторе. Такая культивация широко оптимизирует коммерческое производство ферментов, но только небольшая часть была применена. Ферментационный метод, условия прививания, параметры окружающей среды, которые включают состав питательной среды, температуру, рН, дыхание, влияют на объем ферментов из микрофиламентов грибной культуры. Изменяющийся состав ростовой среды может быть отнесен к специфическому ответу на данный раздражитель или к общему воздействию на рост, морфологию гиф, продукцию белков и клеточную смерть. Глюкоза репрессировала синтез экзоглюназы, эндоглюназы и β-глюкозидазы, изолированных из *T. harzianum* E-58, максимальная активность целлюлаз составила 2.764, 14.4 и 0.629 IU mL⁻¹, соответственно (Ahmed et al., 2005). Однако, улучшения, полученные в маломасштабных ферментационных лабораториях, использующих определенные питательные субстраты могут не всегда приводить к одинаковым улучшениям в крупномасштабных ферментационных культивированиях, где используются дорогие сложные среды.

T. reesei используется для производства ферментов уже 30 лет. В течение этого времени, ее натуральные целлюлазы и гемицеллюлазы нашли свое применение в

различных областях промышленности. Генная технология позволила производителям ферментов достигнуть дальнейшего развития в сфере производства высокопродуктивных штаммов, которые привели к улучшениям качества и дешевизне производства (Mäntylä et al., 1998).

Клонирование целлюлазных генов

Целлюлазы, секретируемые этими грибами, имеют существенные недостатки: обладают низкой каталитической активностью, высокой термолабильностью, практически полностью ингибируются продуктами реакции – глюкозой и целлобиозой (2).

Поэтому для создания эффективной технологии ферментативного гидролиза целлюлозы необходимо создание целлюлаз с заранее заданными свойствами. Одним из путей решения этой задачи может быть выделение, клонирование и целенаправленное изменение нуклеотидной последовательности индивидуальных генов ферментов целлюлазного комплекса с перспективой введения их в геном клеток исходного организма или другого более подходящего реципиента.

Клонирование генов целлюлаз бактерий осуществлено во многих лабораториях, в то же время клонирование генов целлюлаз эукариотических организмов – грибов – задача более сложная из-за структурных особенностей генома. Как правило, гены эукариот имеют интроны, и для синтеза активных белковых молекул необходима система сплайсинга, которой у прокариот нет. Клонирование в *E. coli* целлюлазных генов грибов, содержащих интроны, обычно осуществляется путем предварительного синтеза кДНК (Винтер и др., 1989).

Работы по клонированию целлюлазных генов *Trichoderma* проводились в КГУ в проблемной лаборатории нуклеиновых кислот под руководством проф. В.Г. Винтера с начала 80-х годов (1983-1984). Для клонирования генов целлюлаз *Trichoderma* использовали метод «shot-gun» с использованием челночных плазмид, способных размножаться в *E. coli* и дрожжах (Винтер и др. 1986, 1989, Акберова и др., 1987, 1989). В результате полученные рекомбинантные дрожжи приобретают способность расти на среде с клетчаткой вместо растворимых сахаров, например, на соломе. Перспективы применения таких рекомбинантных дрожжей впечатляют. Одна из многих возможностей – получение высокопитательных полноценных кормов на возобновляемом целлюлозосодержащем сырье.

Винтер с соавторами (1989) клонировали целлюлазные гены из *T. viride* F-90 в клетки *E. coli* IF1125, используя в качестве вектора плазмиды: pBR322, pUC19, pIF91.

Плазмида pBR322 является наиболее широко используемым вектором для самых различных целей клонирования. Показано, что плазмида содержит по единичному сайту для некоторых рестриктаз, в частности, для HindIII и BamHI. В результате действия рестриктаз из плазмиды вырезается фрагмент ДНК длиной 346 п.н. Оставшийся фрагмент ДНК имеет односторонние комплементарные концы и поэтому не происходит его замыкания в кольцо. Так как ген устойчивости к тетрациклину инактивируется рестриктазой BamHI, то полученные рекомбинанты, чувствительные к тетрациклину, что используется при их отборе. Отобранные по этим признакам клоны содержат плазмиды со встроенными по сайту HindIII – BamHI фрагментами чужеродной ДНК.

Исходя из указанных свойств плазмиды pBR322, получены рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты ДНК *T. viride*, с помощью рестриктаз HindIII и BamHI.

В результате проведенной трансформации клеток *E. coli* IF1125 рекомбинантной плазмидой было получено 30 клонов, росших на среде с ампициллином, но чувствительных к тетрациклину. Отобранные клоны выращивали на селективной среде с ампициллином, содержащей в качестве единственного источника углерода КМЦ-Na. Однако рост трансформантов был слабый, поэтому в последующих экспериментах была использована богатая питательная среда LB, обеспечивающая хороший рост клеток.

Анализ колоний рекомбинантов на твердой питательной среде на наличие КМЦазной активности при помощи красителя конго-рот не дал достоверных результатов. Поэтому выращивали клоны в жидкой среде LB в течение 12 часов, собирали биомассу центрифугированием и определяли КМЦазную активность в культуральной жидкости.

Однако и здесь КМЦазная активность не обнаруживалась. Это можно объяснить тем, что клетки *E. coli* практически не секретируют белки в окружающую среду. Учитывая это обстоятельство, мы проводили лизис биомассы и определяли КМЦазную активность в лизатах. Те клоны, лизаты которых образовывали зоны просветления на индикаторной среде, в последующих экспериментах показали наличие незначительной целлюлазной активности по действию на фильтровальную бумагу.

По аналогичной схеме была получена рекомбинантная плаزمида puC19, которой трансформировали клетки *E. coli* ВМН7118. первичный отбор рекомбинантных клонов проводили по фенотипическому признаку на среде, содержащей ампициллин, изопропилтиогалактозид (ИПТГ) и хромогенный агент X-gal. Отобранные клоны исследовали на наличие целлюлазной активности вышеуказанными методами. Кроме этого, проводился электрофоретический анализ ДНК плазмид рекомбинантов, представлены профили плазмидной ДНК puC19, рекомбинантов № 23 и 32.

Так как полученные рекомбинанты имели низкую целлюлолитическую активность, в дальнейших исследованиях нами была использована химерная плазмида pIF91. Она маркирована генами устойчивости к ампициллину и лейцину, способна реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и в дрожжах. В полученных клонах определяли эндоглюканазную активность с помощью красителя конго-рот и по способности гидролизовать окрашенную целлюлозу (ОЦ-31, субстрат для избирательного определения эндоглюканаз).

В результате прямого клонирования целлюлазных генов из *T. viride* в клетки *E. coli* IF1125 с использованием в качестве векторов плазмид pBR322, puC19, puF91 и рестриктаз HindIII и BamHI, были получены клоны рекомбинантов, которые обладали КМЦазной активностью. Так как отобранные клоны *E. coli* росли на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода КМЦ-На, образовывали зоны просветления при окрашивании красителем Конго-рот и гидролизовали ОЦ-31, можно предположить, что был клонирован ген эндоглюканазы. Это подтверждается способностью лизатов рекомбинантов частично гидролизовать фильтровальную бумагу.

В дальнейшем в лаборатории КГУ под руководством Винтера были получены следующие результаты:

- получены рекомбинантные плазмиды, содержащие гены ферментов целлюлазного комплекса;
- отработаны способы отбора рекомбинантных штаммов *E. coli* и дрожжей, проявляющих эндоглюканазную активность;
- исследованы свойства полученных рекомбинантов, их морфологические и биохимические характеристики;
- параллельно изучалась биохимия грибных целлюлаз – особое внимание уделялось поиску специфических субстратов, необходимых для идентификации активности ферментов;
- другое направление – исследование регуляции транскрипции – особое внимание промоторам белков теплового шока (идея: получить такие рекомбинанты, в которых в нужное нам время с помощью повышения температуры до 42°C мы могли бы «запускать» ферменты целлюлазного комплекса).

Самый впечатляющий результат – получены рекомбинантные дрожжи, способные расти на среде с карбоксиметилцеллюлозой (Винтер 1986, 1989).

4.2. Применение ферментов *Trichoderma* в текстильной промышленности

Как было отмечено выше, свой первый успех целлюлазы имели именно в текстильной промышленности (цит. по Galante et al., 1998).

Быстрое и широкое распространение и использование этих ферментов в текстильной индустрии можно объяснить тем, что большинство фабрик, выпускающих одежду, обивку, товары для дома, по крайней мере, частично, имеют дело с чисто целлюлозными материалами (хлопок, лен, вискоза). Одно хлопковое волокно состоит из 15000 микрофибрилл, одна микрофибрилла содержит 400 элементарных фибрилл. В одной элементарной фибрилле – 100 целлюлозных цепей. Хлопковое волокно состоит из кристаллических фибрилл (приблизительно 70% волокна), между которыми найдены аморфные неупорядоченные области (Rouette, 2002). Именно в эти области легче всего проникают красящие и химические вещества.

За последние несколько лет наметилась тенденция нового применения материалов, модификации целлюлозных фабрик и появления новых материалов на основе целлюлозы. Появились совершенно новые биоинженерные целлюлазы, хотя основная часть их описана очень кратко даже в научной литературе из-за промышленной конфиденциальности (Miettinen-Oinonen et al., 2005). Поскольку известно более всего применение целлюлаз для «биошлихтования» текстиля, когда с помощью ферментов удаётся пемзование denim - одежды, такой, как джинсы, то конечная обработка и полирование неджинсовых тканей и предметов одежды становится самой развитой отраслью индустрии. Эта технология позволяет не отставать от переменчивой моды.

Наконец, возрастает применение целлюлаз в моющих средствах и в стиральных порошках для смыва маленьких коротких нитей с поверхностей тканей, что улучшает их внешний вид и яркость. В этой связи проводятся исследования по получению суперпродуктов ферментов целлюлазного комплекса. Дана с соавторами (Dana et al., 2001) получили мутант гриба *Trichoderma aureoviride* 7-121, обладающий повышенной секрецией внеклеточных целлюлазы и β -глюкозидазы (целлобиазы).

Ферментативное пемзование окрашенной одежды с помощью грибных целлюлаз

Название «голубые джинсы» (blue jeans) образовано от «bleu de Gènes», местечка Женева в Италии и одежды докеров темно-голубого цвета. Джинсовой называется любая одежда из такой ткани. Джинсовая одежда пережила время и распространилась во всем мире как самая удобная одежда для отдыха. Молодой эмигрант Леви Штраус из Баварии в середине XIX века во время «золотой лихорадки» в Калифорнии впервые предложил брюки из джинсовой ткани как предмет одежды, и с тех пор популярность джинсов только растет. В настоящее время ежегодно производится 800 миллионов пар джинсов во всем мире, а индустрия джинсовой одежды представляет собой многомиллиардный бизнес (Galante et al., 1998).

Термин «denim» происходит от названия города Ним в Южной Франции, где традиционно производили ткань из окрашенной индиго голубой хлопчатобумажной основы и белой пряжи. Индиго представляет собой натуральный краситель, который экстрагируют из крестоцветных *Indigofera tinctoria* и *Isatis tinctoria*, и известный со времен Шумера. В настоящее время краситель синтезируют в промышленном масштабе из N-фенилглицина. Разработан биотехнологический метод синтеза индиго на основе ферментации рекомбинантным бактериальным штаммом фирмами Amgen и Genesoc International. При приготовлении ткани деним индиго адсорбируется на поверхности пряжи в восстановленной растворимой лейко-форме. Затем краситель окисляется на воздухе и преципитирует, образуя голубые кольца на волокнах неокрашенной ткани. Краситель прикрепляется к поверхности основной нитки и полностью окрашивает небольшие боковые хлопковые фибриллы. Создается эффект

застиранной и ношеной ткани. Этот видимый эффект обеспечил появление всей индустрии производства тканей деним. На текстильных фабриках ткань на основе индиго обрабатывают крахмалом, и ткань становится грубой и толстой. «Новой» такую одежду невозможно носить. В «старые времена» новые джинсы неоднократно стирали, чтобы их можно было носить. Неоднократная стирка приводила к частичному выцветанию ткани, что становилось модным как в среде ковбоев, так и среди героев фильмов. Мода привела к популярности вида несколько «ношенных» и «выцветших» джинсов (Galante et al., 1998).

В конце 1970-х и в начале 1980-х ношенные и выцветшие джинсы получались при стирке одежды в промышленных машинах с кусочками пемзы после обработки α -амилазой. Этот процесс назвали пемзованием или «стиркой камнями». Он позволил многим промышленным прачечным участвовать в бизнесе конечной обработки одежды из ткани деним. Абразивный эффект на ткани появлялся благодаря тому, что краситель локально вымывался, и в этом месте кусочки пемзы истирали белые волокна. В результате одежда приобретала вид выцветший и состаренный. При обычном режиме на 1 кг джинсовой одежды требовалось 2 кг пемзы и 1 ч обработки. Поскольку такая одежда с успехом продавалась на рынке, применение пемзы возрастало, что привело к серьезным проблемам:

- быстрый износ стиральных машин;
- много второсортной продукции вследствие высокой абразивности пемзы;
- экологические проблемы, связанные с отходами, представлявшими собой смесь порошка пемзы, коротких волокон целлюлозы и красителя индиго;
- тяжелые грязные условия труда для работников прачечных, сталкивающихся с пемзовой пылью на полу;
- необходимость тщательно удалять остатки пемзы с одежды и из упаковки.

В середине 1980-х появилась прекрасная замена пемзе и процессу пемзования – микробные целлюлазы. Развитие «биопемзования» создало индустрию целлюлаз (Galante et al., 1998).

Применение целлюлаз для обработки одежды деним. В середине 1970-х и в начале 1980-х гг. появилась концепция добавки целлюлаз в детергенты для удаления частичек почвы и для увеличения мягкости тканей (например, US Pat. No 4,435,307 за 1984 год и др. европейские патенты). В этих патентах говорится о том, что в одном случае в Великобритании изучался эффект своеобразного выцветания, который придает ткани «деним» обработка целлюлазами. Однако, большинство патентов, посвященных этому вопросу, было опубликовано в период с 1988 по 1993 годы Ecolab Inc. и American Company, ставшей в настоящее время частью Henkel Group. На самом деле, оригинальное исследование было проведено в Ecolab Inc. с ферментом, который выпускала датская фирма Novo. Законность этого патента была оспорена US Board of Patent Appeals and Interferences и признана недействительной (цит. по Galante et al., 1998).

Принцип биопемзования очень прост: целлюлазный комплекс при действии на хлопчатобумажную ткань разрушает короткие вторичные волокна вокруг осевой нити, благодаря чему индиго вымывается с этих мест при стирке. Замена пемзы целлюлазами имеет много преимуществ:

- не приводит к изнашиванию машин и сокращает время обработки;
- увеличивает продуктивность машин, поскольку можно обрабатывать больше одежды;
- сокращает количество второсортной продукции;
- облегчает условия труда и не загрязняет окружающую среду;
- самый безопасный процесс, поскольку нет пемзовой пыли;
- процесс становится автоматическим, поскольку за количеством целлюлазы можно следить с помощью компьютера;
- можно легко создавать новые эффекты.

Перемещение красителя индиго. При обработке ткани целлюлазным комплексом *Trichoderma reesei* наблюдается перемещение красителя индиго и возвратное окрашивание. Этот феномен можно описать так: истирание волокон, окрашенных индиго, приводит к переходу красителя в раствор. Краситель из раствора снова переходит на ткань, меняя свое положение. Возникает эффект повторного окрашивания. Основные нити и волокна становятся ярко-голубыми. В результате, слишком явный контраст белого и голубого обработанной одежды затушевывается благодаря возвратному окрашиванию. Важной целью всей технологии «биопемзования» стало контролирование возвратного окрашивания ткани индиго, особенно в тех случаях, когда не применяли отбеливание для повышения эффекта истирания и более резкого контраста между белым и голубым. Уровень истирания и возвратного окрашивания можно вычислить путем измерения отражения внешней и внутренней стороны изделия с помощью аппарата, измеряющего цветность в единицах шкалы от 420 до 680 нм. Максимальное истирание соответствует 420 нм, а минимальное возвратное окрашивание – 680 нм (Gusakov et al., 2000).

В промышленном масштабе можно использовать две целлюлазы: кислую целлюлазу при pH 5 – 5,5 и нейтральную целлюлазу при pH 6 – 6,5. Хотя считается, что первичной причиной возвратного окрашивания является pH раствора (чем более низкий pH, тем выше уровень возвратного окрашивания), необходимое для действия фермента, особой разницы между обработкой при pH 5 и pH 7 не обнаружено. А вот разница в случае кислой целлюлазы и нейтральной целлюлазы значительная. Другими словами, pH рабочего раствора является меньшей причиной возвратного окрашивания, чем природа целлюлаз, используемых в процессе. Кислая целлюлаза, а это комплекс *Trichoderma*, постоянно вызывает более интенсивное возвратное окрашивание. Нейтральные целлюлазы, активные при pH от 6 до 8 и оптимумом pH 6,5 менее агрессивны и вызывают меньшее возвратное окрашивание при обработке изделий из джинсовой ткани (Galante et al., 1998).

Самой известной нейтральной грибной целлюлазой, используемой при биопемзовании, является фермент термофильных гнилостных грибов *Humicola insolens*. Этот сапрофитный гриб продуцирует по крайней мере 6 различных эндоглюканаз и 2 целлобиогидролазы, гены которых клонированы (Murashima et al., 2000). Фермент продается в растворе и в виде сухого препарата под маркой DenimaxTM для всех целлюлаз *Humicola*, производимых фирмой Novo Nordisk. Целлюлазный комплекс *Humicola* состоит из семи различных целлюлаз, имеющих различные оптимумы pH и температуры. По биохимическим свойствам целлюлазы *Humicola* напоминают ферменты *Trichoderma reesei*. На рисунке 4.1 отражены сравнительные показатели уровня истирания и степени возвратного окрашивания при стандартных условиях обработки одежды из джинсовой ткани с помощью целлюлаз *Humicola* и целлюлаз *Trichoderma* при pH 7 и pH 4,8 соответственно. В контроле ферменты не использовали, хотя режим стирки сохранялся. Более высокая степень отражения при 680 нм в случае *Humicola* показывала более низкую степень возвратного окрашивания, тогда как более низкая степень отражения при 420 нм в случае *Trichoderma* по сравнению с *Humicola* говорит о более высокой степени возвратного окрашивания.

Для того чтобы можно было применять целлюлазы *Trichoderma reesei* при специфической обработке, были предприняты некоторые попытки решить проблему возвратного окрашивания, и с успехом использовать эти ферменты для биопемзования. Эти методы предполагали поддержание тщательного баланса дозы фермента, количества раствора, времени обработки, не ингибирующих ферменты неионных детергентов и, в основном, обработки изделий после биопемзования с помощью детергентов или даже отбеливателей, типа гипохлорита. На самом деле, были разработаны коммерческие препараты целлюлаз *Trichoderma*, содержащие смесь ферментов, буферы, ингибиторы перемещения красителя, стабилизаторы. Такой

препарат было удобно использовать, что удешевляло всю процедуру биопемзования (Galante et al., 1998).

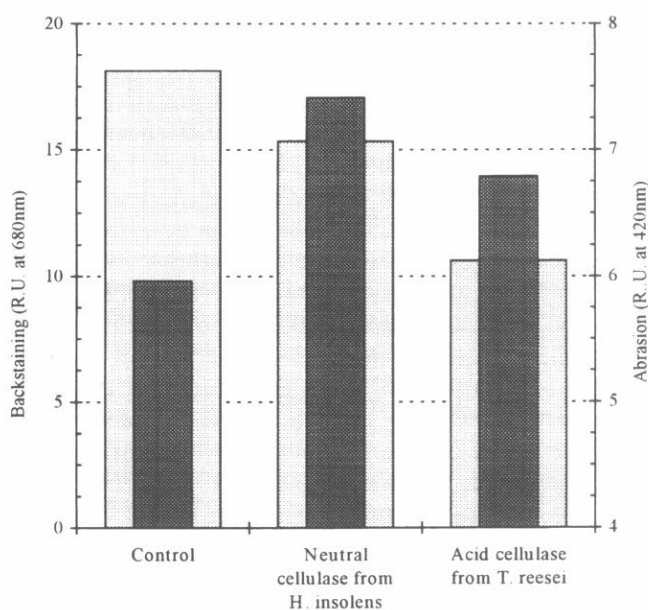


Рис. 4.1. Оценка истирания и возвратного окрашивания ткани деним с помощью измерения отражения в случае обработки ткани нейтральной целлюлазой *Humicola insolens* и кислой целлюлазой *Trichoderma reesei*. Серые столбики обозначают возвратное окрашивание, черные – истирание; R.U. – единицы отражения (рис. адаптирован из Galante et al., 1998).

Существуют кислые целлюлазы, вызывающие низкую степень перемещения индиго, и нейтральные целлюлазы, вызывающие высокую степень перемещения красителя. Таким образом, профиль pH целлюлазного комплекса не должен быть единственным критерием, определяющим применимость для биопемзования. Целлюлазы *Trichoderma* более агрессивны, поэтому время обработки можно сократить, в отличие от нейтральных целлюлаз. Режим обработки с применением целлюлаз *Trichoderma* следует более тщательно контролировать, чтобы не снизить показатель прочности ткани. К тому же целлюлазы *Trichoderma* дешевле, и чаще всего используются в Америке и на Дальнем Востоке (Galante et al., 1998).

Есть сообщения о том, что эндоцеллюлазная активность наиболее важна для вымывания красителя индиго. Также представлено интересное объяснение (экспериментально не проверенное) феномена возвратного окрашивания. Авторы считали, что действие СВН приводит к высвобождению большего количества растворимых сахаров, которые способны восстанавливать индиго и, таким образом, усиливают перемещение красителя. Более низкую степень возвратного окрашивания в случае препаратов нейтральных целлюлаз *Humicola* можно объяснить более высоким содержанием в них эндоцеллюлазной активности. В опытах Галанте с соавторами (Galante et al., 1998) внесение в раствор с целлюлазами *Humicola* восстановленных сахаров не приводило к возрастанию степени перемещения красителя. Был сделан вывод о том, что данным фактом нельзя объяснить феномен возвратного окрашивания.

Интересные данные были получены и запатентованы исследователями Genecolor International (WO 93/25655 and WO 94/29426). Авторы обнаружили, что перемещение голубого индиго при биопемзовании с помощью кислой целлюлазы *Trichoderma* можно предотвратить, добавив в раствор бактериальную протеазу (типа субтилизина) вместе с целлюлазой. Можно предварительно перемешать раствор с протеазой до того, как целлюлазы добавят в машину. Приведено объяснение этого явления: «...протеаза эффективно отделяет молекулы целлюлаз и предотвращает повторное связывание целлюлаз с окрашенными частицами и не позволяет оказывать слишком сильное абразивное действие на ткань». Конечно, существует некое оптимальное соотношение

между протеазой и целлюлазами, при котором достигается предотвращение возвратного окрашивания и ингибируется истирание в основном благодаря протеолитической атаке молекул целлюлаз. В такой системе контроль pH очень важен для управления активностями обеих систем ферментов. С другой стороны, нет еще твердых доказательств того, что повышение доли эндоцеллюлаз в препарате *Trichoderma* или препарат, содержащий одну эндоцеллюлазу *Trichoderma reesei*, лучше препарата, содержащего весь комплекс (хотя в некоторых случаях это имело место). Появление на рынке рекомбинантных препаратов, содержащих повышенную долю эндоцеллюлаз, и препаратов, содержащих единичные ферменты, позволяют проверить нашу гипотезу. Очень важно то, что в генетической инженерии второго поколения целлюлаз *Trichoderma* используются три различных подхода: клонирование единичного гена (СВН или EG) для получения монокомпонентного препарата, выключение суперпродукции одного или нескольких генов (СВН) для получения препарата, обогащенного одной группой ферментов (например, EG). Например, сообщалось о выделении, клонировании и экспрессии гена эндоцеллюлазы III *Trichoderma reesei*, а также о выделении EGIII и создании монокомпонентного препарата (патенты фирмы Genecolor International WO 93/20208, WO 92/20209 and WO 94/21801) (цит. по Galante et al., 1998).

В исследованиях по получению целлюлаз, применяемых для заключительной обработки хлопковой ткани, созданы пять типов штаммов суперпродуцентов целлюлогидролаз: суперпродуценты СВНI, содержащие и не содержащие эндоцеллюлазу I (EGI), суперпродуценты СВНII, содержащие и не содержащие эндоцеллюлазу II (EGII), и штаммы суперпродуценты СВНI и СВНII, не содержащие эндоцеллюлазы I и II (Miettinen-Oinonen et al., 2005). Одна дополнительная копия гена *cbh1* увеличивала продукцию белка СВНI в 1.3 раза, а две копии – в 1.5 раза. Уровень общей секреции белков возрастал у СВНI-трансформантов по сравнению с исходным штаммом. Одна копия кассеты с геном *cbh2*, который экспрессировался под промотером *cbh1*, увеличивала продукцию белка СВНII в три-четыре раза по сравнению с исходным штаммом. Сконструированы штаммы *T. reesei*, продуцирующие повышенный уровень СВНI и СВНII, не содержащие EGI и EGII, путем перемещения локуса *egl1* с кодирующей областью гена *cbh1* и локуса *egl2* с кодирующей областью гена *cbh2*. Ген *cbh1* экспрессировался под своим собственным промотером, а *cbh2* – под промотерами обоих генов. Продукция белка СВНI СВН-трансформантами возросла в 1.6 раза, а продукция белка СВНII в 3.4 раза по сравнению с исходным штаммом. Примерно похожее количество белка СВНII продуцировалось с использованием *cbh1* и *cbh2* промотеров. При использовании ферментного препарата с повышенным содержанием СВНII для заключительной обработки хлопковой ткани показаны лучшее удаление волосков и лучший внешний вид по сравнению с применением препарата дикого типа. Кроме того, проводятся исследования по оптимизации условий получения целлюлаз (Juhasz et al., 2005; Krishna et al., 2000).

Считается, что кроме включения в состав моющих средств, «...EGIII можно использовать в процессе биопемзования окрашенных тканей, когда возвратное окрашивание нежелательно. Его можно снизить путем добавления гомогенного препарата очищенной EGIII» (патент WO 94/21801). Этот эффект может быть связан с тем, что оптимум pH EGIII расположен около 6, а не около 5,5 для других целлюлаз. Отсутствие целлюлозосвязывающего домена в EGIII также может способствовать низкой степени перемещения красителя (Galante et al., 1998).

Обработка целлюлазой неджинсовых тканей. Главная цель всех исследований и разработок ферментов для текстильной промышленности – улучшение качества целлюлозных тканей с помощью обработки целлюлазами. Большинство природных материалов, с которыми имеют дело производители тканей, состоит из целлюлозных волокон: хлопок, лен, вискоза, лиосел (материал, приготовленный путем экструзии

древесины растворителями) и различные смесовые ткани, содержащие синтетические волокна. С разной степенью, но все целлюлозные материалы имеют тенденцию формировать пух на своей поверхности. Пух состоит из коротких волокон, выступающих над поверхностью основных волокон. Во время обработки и стирки пух скатывается и остается на поверхности изделия. Образование пуха и катышков на одежде зависит от вида целлюлозных волокон и промышленной обработки ткани. При обработке дешевых тканей весь режим отстающих фабрик направлен на образование пуха и катышков на изделии, тогда как современная тенденция состоит в том, чтобы выбирать режим обработки тканей, предотвращающих распушение волокон. Во всех случаях образование пуха является отрицательным свойством целлюлозных тканей. Предотвращение этих негативных черт повышает коммерческую привлекательность изделий и текстиля. В отличие от традиционной обработки катионными поверхностно активными веществами целлюлозные ткани должны подвергаться воздействию целлюлаз в процессе, который называется «биополировка» (патенты Novo Nordisk WO 93/20278 анд WO 94/12578). «Биополировка» обычно проводится на стадии влажной ткани, которая включает дизайн, шлихтование, отбеливание, крашение и окончательную обработку. Очень важно то, что в результате действия целлюлаз гидролизуются и вымываются небольшие волокна, выступающие над поверхностью ткани. Ферменты ослабляют волокна, но для их отделения необходимы механические усилия, которые заканчивают весь процесс «биополировки». Механическое отделение может быть выполнено на оборудовании для отмывания. Но чтобы не произошло истирания ткани, следует особенно тщательно выбирать состав раствора (Galante et al., 1998).

Существуют преимущества использования целлюлаз в обработке целлюлозных тканей и изделий:

- отделение испорченной и неокрашенной целлюлозы, катышков и пуха;
- придание ткани гладкой, приятной на ощупь поверхности, блеска и шелковистости;
- ткань легче очищается;
- улучшается окрашивание, повышается устойчивость, придается блеск;
- повышается гидрофобность ткани, она легче адсорбирует воду;
- повышается качество тканей и одежды из такой ткани;
- позволяет создавать новые эффекты на ткани;
- представляет собой экологичный процесс.

Очевидным преимуществом «биополировки» является то, что она оказывает на ткани долговременный эффект, образование катышков и пуха не происходит вообще. Прочность материала со стирками не исчезает. Напротив, когда конечная обработка тканей производится с помощью химических агентов, они со временем вымываются, и одежда теряет свой внешний вид. Обработка целлюлазой неджинсовых материалов называется «биополировка» или «биофиниширование». В этом процессе перемещение индиго не имеет значения, поскольку используются другие красители. Вместо этого существует проблема сохранения веса и прочности ткани при обработке ферментами, чтобы вместе с дефибрилляцией ткани не пострадала ее целостность, и не образовались тени на окрашенной ткани. Сохранение прочности ткани особенно важно для льняного полотна и вискозных тканей. Лен содержит значительное количество аморфной целлюлозы, имеющей низкую степень полимеризации, поэтому лен быстро размягчается при воздействии целлюлаз. Также вискоза рэйн относится к слабым тканям, особенно во влажном состоянии. Поэтому «биополировку» пряжи проводить нельзя, вместо этого следует проводить обработку целлюлазами только ткани в метрах, кусков ткани или готовых изделий (например, футболок, брюк, рубашек, свитеров, постельного белья и полотенец). «Биополировку» можно проводить до или после окрашивания или нанесения рисунка. Однако, часто ее проводят после отбеливания и

перед окраской, но иногда (особенно в случае футболок и рубашек) также после окрашивания. Когда проводится обработка окрашенной или неокрашенной одежды, проводится сильная механическая обработка, поскольку при «биополировке» используются менее агрессивные ферменты в низких дозах. Если проводят «биополировку» кусков ткани или ткани в метрах, то применяют более агрессивные ферменты, но сокращают время механической обработки материала (Galante et al., 1998).

Окончательную обработку или «биофиниширование» чаще всего проводят с использованием более агрессивной кислой целлюлазы, чем нейтральной целлюлазы. Таким образом, применяемые препараты содержат либо весь целлюлазный комплекс *Trichoderma reesei*, либо рекомбинантные ферменты, лишенные или обогащенные отдельными субъединицами. Типичное «биофиниширование» состоит в обработке материала целлюлазами в течение 30-90 мин при температуре 45-55°C и pH 4,5–5,5. Соотношение раствора ферментного препарата к материалу в кг составляет 5:1 или 20:1 в зависимости от вида материала и дозы фермента. После обработки фермент можно инактивировать путем защелачивания раствора до pH 9-10 и/или путем нагревания до 70-80°C в течение 10 мин. Если фермент не удастся инактивировать, то материал можно повредить. Эффективность конечной обработки зависит от предварительных операций с материалом, таких, как стирка, отбеливание, мерцеризация, окрашивание и т.д. Например, эффективность ферментов выше на мерцеризованной хлопчатобумажной ткани, чем на необработанной, поскольку мерцеризация снижает кристалличность целлюлозы. Данные аспекты следует учитывать при планировании пилотных или промышленных опытов по испытанию коммерческих целлюлаз. Более того, скорость гидролиза целлюлозы снижается в присутствии анионных восстановленных красителей, но остается постоянной в присутствии неионных красителей. Как описано ранее, ферментативное воздействие на текстильные ткани в основном изучено путем механистических расчетов самого процесса катализа. Все другие параметры были уравнены. В последнем случае было очевидно, что трудно предугадать картину на смесовых тканях, поскольку разные волокна будут служить различными субстратами для ферментов. Таким образом, очень трудно, или даже невозможно, стандартизировать обработку всех типов текстиля. Рекомендуется проводить крупномасштабные опыты для того, чтобы установить оптимальные условия обработки с помощью каждого препарата целлюлаз для расчета всех показателей процесса. Для расчета прибыли с новыми препаратами промышленные опыты необходимы (Galante et al., 1998).

Дефибрилляция искусственных целлюлозных волокон. Лиосел – общее название тканого материала, состоящего на 100% из целлюлозных волокон, полученных путем экстракции бумажной пульпы раствором с аминоксидазой и растворителями. Раствор снова возвращается в закрытую циклическую систему, и полученную взвесь фильтруют через отверстия, чтобы получились волокна. Полученные волокна содержат равные количества аморфной и кристаллической целлюлозы на старте, даже если кристалличность определяется в процессе экструзии. Это первый тип новых волокон, разработанных для текстильной промышленности в течение последних 30 лет. Волокна лиосела совмещают комфортные свойства природных волокон с высокой прочностью, свойственной синтетическим волокнам. Была зарегистрированная марка нового класса волокон лиосела Tencel^R и производилась фирмой Courtaulds Fibres Ltd. Положительные свойства волокон лиосела: высокая устойчивость к усадке после стирки, к растяжению и разрывам, способность к адсорбции и низкий статический электрический заряд (свойственно природным волокнам). Лиосел легко смешивается с другими волокнами, люреком и шелком. Однако, на поверхности тканых или трикотажных тканей из лиосела видны спутанные волокна, называемые «фибрилляцией». Фибрилляция усиливается при

высокой температуре и механической обработке. Хотя это негативное свойство лиосела, оно не помешало разработать целый спектр режимов «биофиниширования». На самом деле, с фибрилляцией можно бороться с помощью целлюлаз. Установлено, что кислая целлюлаза является самым эффективным средством. Для обработки смесовых тканей на основе лиосела можно использовать препараты с нейтральной целлюлазой. Прибыль, получаемая в результате применения целлюлаз, примерно равна прибыли, вычисленной для режима с нейтральной целлюлазой. Прибыль возникает в результате значительного улучшения внешнего вида тканей на основе лиосела и смесовых тканей в результате смягчения и увеличения прочности и внешнего вида при стирке (Galante et al., 1998).

Конечные результаты обработки Tencel^R определяются уровнем комбинации механических, химических и ферментативных процессов. Обычно высокая степень фибрилляции преднамеренно достигается при комбинации высоких значений pH, высокой температуры и механического истирания. Эта так называемая первичная фибрилляция возникает в основном при расположении длинных волокон по поверхности ткани. Атака целлюлазами тканей с первичной фибрилляцией приводит к очистке поверхности ткани. При необходимости можно вызвать вторичную стабильную фибрилляцию во влажных условиях и разработать новые режимы окончательной обработки материалов. Универсальность лиосела лучше всего используется на конечной стадии, когда обработка целлюлазами дает максимальный эффект. Поэтому не удивительно, что многие производители ферментов постарались разработать новые препараты целлюлаз для обработки швейных изделий из лиосела. Эти новые препараты призваны решить многообразные задачи, прежде всего, обеспечить разнообразные воздействия на смесовые и другие волокна, увеличить прочность тканей, адаптировать волокна к высокоскоростным вязальным машинам и к смешению с химическими и шелковыми нитями (Galante et al., 1998).

Путем генной инженерии получены два препарата, обогащенные эндоглюканазной активностью. Препараты были выпущены на рынок фирмой Novo Nordisk в 1995 году и фирмой Genecolor International в 1996 году и были использованы для обработки тканей на основе лиосела (цит. по Galante et al., 1998).

Необходимо отметить, что коммерческая доступность новых искусственных волокон, таких как лиосел, является движущей силой применения целлюлаз *Trichoderma reesei* в текстильной индустрии и развития новых биоинженерных компонентов природного целлюлазного комплекса (Galante et al., 1998).

Препараты, обогащенные эндоцеллюлазами для биофиниширования. Исследования в области целлюлаз привели к появлению новых ферментов, с помощью которых можно обработать тяжелый хлопок и лен без значительных изменений прочности и эластичности (Miettinen-Oinonen et al., 2005). Как и в случае биополировки, в случае биофиниширования лучшие результаты показывают препараты с эндоглюканазной активностью. Изъятие СВН из целлюлазного комплекса приводит к увеличению прочности и сохранению веса ткани. В данном вопросе приводится много взаимоисключающих сообщений. Описано применение целлюлазного препарата генетически модифицированного штамма *Trichoderma reesei*. Выключение гена *egl2*, кодирующего EGII, приводило к снижению эндоглюканазной активности препарата.

Использование при биопемзовании ткани деним препарата со сниженной эндоглюканазной активностью II приводило к снижению прочности ткани на 15% ниже, чем при использовании полного целлюлазного комплекса при том же уровне истирания. Также эксперименты по «биополировке» хлопчатобумажной ткани показали, что применение препарата со сниженной эндоглюканазной активностью II позволили сократить потери прочности ткани в зависимости от дозы фермента. Потери веса ткани были соизмеримы в случае обоих препаратов. Опыты показали, что обработка хлопчатобумажных волокон препаратом со сниженной эндоглюканазной

активностью II сделала волокна более гладкими, без коротких фибрилл. Авторы делают вывод о том, что модифицированные препараты целлюлаз *Trichoderma reesei* со сниженной EGII активностью удобнее применять для биопемзования и «биополировки» хлопка для сохранения прочности и предохранения от повреждения основных волокон (цит. по Galante et al., 1998).

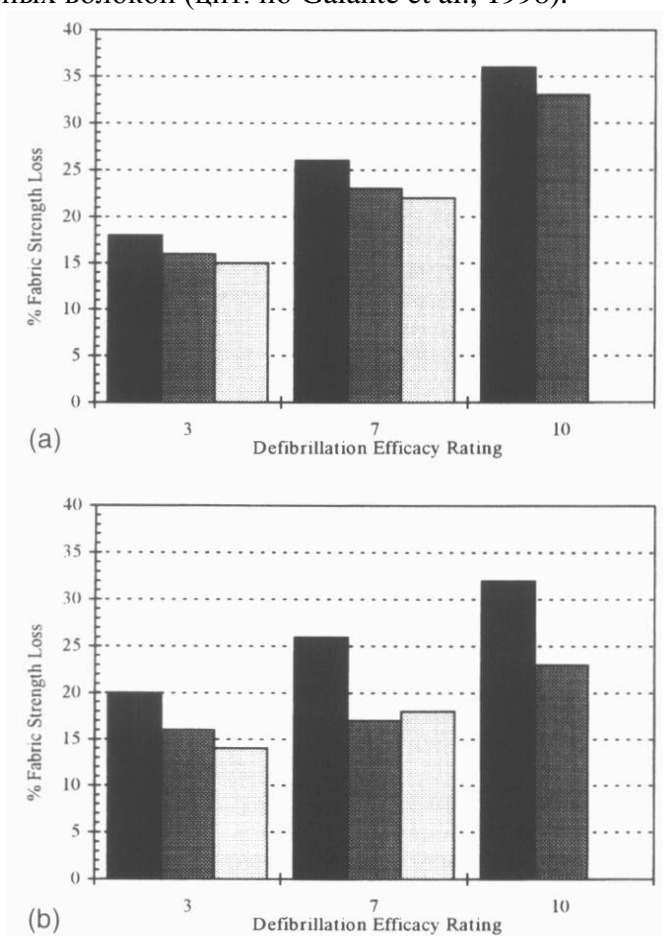


Рис. 4.2. (а) Снижение прочности ткани на основе 100% лиосела от степени эффективности дефибрилляции; (б) снижение прочности смесовой ткани лиосел/хлопок в соотношении 65/35 от степени эффективности дефибрилляции; черные столбики обозначают полный целлюлазный комплекс №1, менее темные столбики – препарат, обогащенный эндоглюканазной активностью №2, светлые столбики – препарат, обогащенный экзоглюканазной активностью №3 (рис. адаптирован из Galante et al., 1998).

Другие авторы сравнили результаты применения трех различных композиций кислых целлюлаз (все были получены из *Trichoderma reesei*) для дефибрилляции различных смесовых тканей на основе лиосела (Galante et al., 1998). Точный состав каждой композиции опубликован не был, хотя сообщалось, что одна композиция представляет собой полный целлюлазный комплекс, а две другие содержат повышенное количество эндоглюканазной активности и сниженное количество экзоцеллюлазной активности. После обработки ткани тремя препаратами, в образцах ткани определяли степень дефибрилляции, уровень прочности и вес (рис. 4.2).

Эффективность препаратов выражалась как степень дефибрилляции. Для чистоты экспериментов в раствор не были добавлены увлажнители, стабилизаторы и т.д. Показано, что самым эффективным препаратом была композиция целлюлаз *Trichoderma reesei*, обогащенная эндоглюканазной активностью. Степень дефибрилляции ткани на основе лиосела составила 100%. Потери прочности смесовой ткани, содержащей хлопок и лиосел в соотношении 35/65, были снижены в случае препарата по сравнению с вариантом, где использовали полный целлюлазный комплекс. Второй препарат, обогащенный эндоцеллюлазной активностью, был эффективнее в случае биополировки и в случае, когда сохранение прочности было самым главным – при

обработке смесовой ткани лиосел/лен. В заключение было сказано, что препараты, содержащие полный целлюлазный комплекс, значительно отличаются по своим свойствам от модифицированных препаратов целлюлаз. Препараты, обогащенные эндоцеллюлазной активностью, удобно применять, когда сохранение прочности и веса материалов очень важно, и потери этих свойств можно минимизировать (Galante et al., 1998).

Изучено влияние интенсивности механических колебаний на скорость катализа чистых эндоглюканаз и полного целлюлазного комплекса. Показано, что механическое колебание воздействует на скорость катализа двумя путями, в зависимости от степени адсорбции фермента на ткани. Сделан вывод о том, что высокий уровень колебаний повышает активность эндоглюканаз в большей степени, чем экзоглюканаз и полного целлюлазного комплекса, что предоставляло шанс использовать синергизм всех компонентов комплекса. Выводы можно применить в случае появления новых препаратов, обогащенных эндоглюканазами. При измерении кинетических параметров реакции в течение всего процесса и сделан вывод о том, что существует синергизм между механическими колебаниями и целлюлазной активностью, поскольку механические колебания облегчают диссоциацию ферментов с поверхности волокон. Пользуясь промышленным опытом, авторы считают, что, какой бы привлекательной не была гипотеза, основанная на лабораторных опытах, невозможно использовать сразу новый препарат только на основании его биохимического состава и свойств. Нужны ясные и четкие промышленные испытания, чтобы адаптировать препарат к промышленным условиям (Galante et al., 1998).

Таким образом, в требования к коммерческим ферментам, применяемым для «биополировки» и «биофиниширования», включены высокая степень дефибрилляции и сохранение прочности ткани.

Препараты на основе литических ферментов *Trichoderma* в России

Для предприятий легкой промышленности в России на основе *Trichoderma* выпускается препарат Целловиридин-В Г20х. Это комплексный ферментный препарат, продуцируемый культурой *Trichoderma reesei*. Содержит в своем составе:

целлюлазу – 2000 ед/г;

бета-глюканазу – до 1000 ед/г;

ксиланазу – до 1600 ед/г;

глюкоамилазу – до 20 ед/г.

Оптимальные условия действия:

рН.....4,0-6,0;

Температура.....50-60°С;

Диапазон действия:

рН.....3,0-7,0;

Температура.....30-70°С.

Применение Целловиридина-В Г20х в лёгкой (текстильной) промышленности

На основе ферментного препарата Целловиридин-В Г20х в Институте химии растворов РАН разработан биопрепарат «Ворсолен», представляющий собой полиферментную композицию, обеспечивающую локальную деструкцию полисахаридных примесей клеточной стенки элементарных волокон и соединяющих их срединных пластинок.

Благодаря применению данного препарата получена возможность придания льняным тканям оригинального замшеподобного вида (эффект «персиковой кожи»), который обеспечивается путём образования сплошного неориентированного застила на поверхности полотна в результате ворсования.

Льняные материалы, в отличие от хлопка или шерсти, в нативном немодифицированном состоянии, как известно, не поддаются ворсованию в связи с высокой природной жёсткостью элементарных волокон.

Под действием Целловиридина-В Г20х происходит расслоение выступающих на опорную поверхность участков элементарных волокон на отдельные макрофибриллы, которые способны разрываться при воздействии гарнитуры. Дробление элементарных волокон на опорной поверхности полотна маскирует переплетение нитей, придавая обрабатываемой стороне ткани замшеподобный вид. Вместе с тем, закреплённые в пряже концы волокон предупреждают их осыпание из ткани, что обеспечивает образование устойчивого поверхностного застила.

Ферментативная обработка способствует снижению показателя жёсткости льняных полотен, нарастающему с увеличением концентрации препарата Целловиридин в технологической композиции и продолжительности её воздействия на волокно.

Опытным путём разработчиками найдено оптимальное соотношение технологических параметров режима ферментативной модификации:

- концентрация препарата «Ворсолен» – 3-5 г/л;
- продолжительность биомодификации – 30-40 мин.

4.3. Применение ферментов в пищевой и кормовой промышленности

4.3.1. Алкогольное производство

Производство алкогольных напитков путём ферментации зерновых известно ещё со времён Вавилона. Вино производят из винограда и других фруктов, процесс ферментации зерновых не является спонтанным, несмотря на то, что фракция крахмала и белков модифицируется ферментами, что приводит к образованию ферментируемых субстратов и питательных веществ для дрожжей (цит. по Galante et al., 1998).

Традиционно пиво готовится из солода, хмеля, дрожжей и воды, но технология пивоварения главным образом основана на действии ферментов, которые активируются во время приготовления солода и затем в процессе ферментации. При приготовлении солода из ячменя происходит прораствание семян и активирование биосинтеза специфически эндогенных гидролитических ферментов, которые модифицируют питательные запасы семени до тех пор, пока прораствание предотвращается нагреванием и обезвоживанием. В этот процесс включается 4 главные категории ферментов: α - и β -амилазы, карбоксипептидазы, и β -глюканазы. Ферменты действуют синергично и в оптимальном режиме. Качество пивоваренного солода, таким образом, определяется ингредиентами, квалификацией и качеством приготовления солода. Во многих пивоваренных предприятиях по всему миру используются альтернативные источники ферментируемых углеводов, если солод низкокачественный, либо недоступен, либо очень дорог. Например, можно использовать насоложенный ячмень, пшеницу, рис в комбинации с солодом в процессе осоложения. Однако существует проблема, поскольку ячмень по сухому весу содержит 6-10% некрахмальных полисахаридов, в основном, β -глюканы. Обычно β -глюканы ячменя состоят из 30% 1,3- и 70% 1,4- глюкозных единиц, что в отличие от целлюлозы делает данные полисахариды более менее растворимыми в воде в зависимости от молекулярного веса. Растворимые β -глюканы ячменя могут формировать гель в процессе пивоварения, что приводит к плохой фильтрации суслу, замедлению фильтрации суслу, понижению концентрации экстрактивных веществ или вызывает помутнение конечного продукта. Пентозаны (арабиноксиланы) и белки так же вызывают помутнение продукта, кроме того, качество ячменя и солода, используемого

в пивоварении, зависит от сезона и погоды. Неблагоприятными условиями считается высокая влажность или осадки, что приводит к понижению качества ячменя и солода (Sørensen et al., 2005).

Ячмень, не прошедший соложение, содержит очень низкий уровень β -глюканазной активности, тогда как активность эндогенных β -глюканаз солода, варьирует в зависимости от ряда факторов (сорт ячменя, сезон, условия хранения), кроме того, ферменты, продуцируемые во время прорастания чувствительны к нагреванию. Из всего вышесказанного очевидно, что повышенную вязкость суслу или ферментационного бульона и присутствие β -глюканов вряд ли может быть преодолено эндогенными β -глюканазами. Для того, чтобы преодолеть проблемы с фильтрацией в пивоварении при первичной ферментации и при осаждении добавляют микробные β -глюканазы. Данные ферменты гидролизуют 1,4-гликозидные связи, что приводит к образованию коротких полимеров, которые содержат ещё 1,3-связи, что приводит к образованию частично средней вязкости. β -глюканазу в основном получают из *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma reesei* (цит. по Galante et al., 1998).

При сравнительном изучении характеристик разных β -глюканаз, используемых при производстве пива, сделан вывод о том, что наиболее экономически привлекательный препарат приготовлен на основе ферментов *Trichoderma*, при сравнении цены и активности. В другом исследовании было показано, что снижение вязкости бульона вызывалось в основном при действии EGII и CBGII на β -глюканы ячменя (Galante et al., 1998). В типичном случае добавка коммерческого целлюлазного препарата *Trichoderma reesei* (0,05-0,1мл/кг субстрата) приводит к снижению содержания β -глюкана на 90% и снижает время фильтрации на 30%. Фильтрационная способность (V_{max} на мл) постоянно повышается при увеличении дозы в пилотном опыте. Этот же фермент был использован для повышения фильтрации при первичной фильтрации. Добавление фермента при приготовлении солода или при первичной ферментации не изменяет вкусовые качества пива: они сравнимы со вкусом пива, без добавления. В пилотном исследовании были проверены активности трёх коммерческих β -глюканаз, полученных из разных микроорганизмов при действии на различные смеси (65% солод/35% ячмень; 65% солод/35% рис; 50% солод/15% ячмень/35% рис). Препараты были получены из *Trichoderma*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, соответственно по их влиянию на скорость фильтрации и общую производительность пивоваренного производства (цит. по Galante et al., 1998).

Таким образом, β -глюканазы *Trichoderma* служат для повышения эффективности в пивоварении. Использование целлюлазных ферментов в течение периода соложения зерна может быть другим подходом. Использование целлюлаз при соложении улучшает качество солода независимо от сезонных различий между урожаем ячменя. Фильтрационная способность суслу и конечного пива значительно улучшается, что приводит к повышению скорости противления пива, что важно, фермент деградирует высокомолекулярной фракции клеточной стенки, что подтверждено данными электронной микроскопии. Это улучшает проникновение экзогенной глутариллиновой кислоты в зерно, что приводит к ускорению синтеза эндогенных гидролитических ферментов (Galante et al., 1998).

Сконструированы глюканолитические пекарские дрожжи путём интегрирования гена глюканазы *Trichoderma reesei* в промышленные пекарские дрожжи. Полученные дрожжи экспрессировали внеклеточные β -глюканазы, которые эффективно гидролизуют β -глюканы и снижали вязкость в течение первичной ферментации, что значительно улучшало фильтрационную способность пива невысокого качества. В будущем данные глюканолитические рекомбинантные штаммы станут привлекательными для пивоварения, при котором добавление экзогенных микробных

ферментов недопустимо по традиционной технологии или запрещается местными законами (цит. по Galante et al., 1998).

Для предприятий спиртовой промышленности в России выпускается полный набор комплексных ферментных препаратов, не уступающих импортным аналогам по набору ферментов, длительности и глубине гидролиза: Целловиридин Г18х (А 2000 ед/г) – жидкие формы и Целловиридин Г20х (А 2000 ед/г) – сухие формы. В России ферменты в производстве спирта используются для расщепления содержащихся в зерне некрахмалистых полисахаридов и белковых полимеров на простые усвояемые соединения. Содержание некрахмалистых полисахаридов (НПС) в различных видах зерна представлены в таблице 4.1:

Т а б л и ц а 4.1

Содержание некрахмалистых полисахаридов в различных видах зерна

Вид зерна	Некрахмалистые полисахариды, %			Общие НПС, %
	Целлюлоза	Арабиноксиланы	β-глюканы	
Ячмень	4,2	7,3	4,9	до 16,5
Пшеница	2,0	6,0	1,0	до 9,0
Рожь	1,5	8,6	2,4	до 14,0

Сейчас большее количество спиртовых заводов в России используют для осахаривания крахмалистого сырья ферментные препараты микробного происхождения, а не солод. Это связано с тем, что эти препараты имеют более широкий спектр действия. Они гидролизуют не только крахмал, но и некрахмалистые полисахариды и белковые полимеры, повышая тем самым выход спирта. Ферментные препараты микробного происхождения используются при любой схеме подготовки сусла и адаптированы к гидролизу отечественного зернового сырья. Они не ингибируют друг друга и могут использоваться совместно. В результате применения ферментных препаратов получается глубоко осахаренное сусло – 79-86% моносахаридов (при осахаривании солодом – 22-29%)

В состав комплексных ферментных препаратов входят биологически активные вещества, необходимые для роста дрожжей, и ионы кальция – эффективные стабилизаторы и активаторы ферментов на стадии применения.

Выгоды от использования ферментных препаратов вместо солода:

Во-первых, комплексные ферментные препараты позволяют оперативно запустить производство после профилактических или незапланированных остановок.

Во-вторых, можно исключить из технологического процесса нестандартный компонент – солод. А это значит, что высвобождаются и солодовое зерно на стадии осахаривания, и производственные помещения (солодовни), и персонал с трудоемкой стадии выращивания солода.

В-третьих, использование ферментных препаратов сокращает время брожения на **10-20 часов**, а выход спирта увеличивает на **1-4%**.

Появляется возможность возврата до **30%** фильтрата барды на приготовление замеса (в рамках безотходной технологии переработки крахмалистого сырья) и внедрения технологии производства с повышенной до **24%** концентрацией сусла.

И, наконец, себестоимость продукции может быть значительно снижена.

Для какой схемы производства спирта подходят ферментные препараты?

Ферментные препараты могут использоваться для выпуска спирта как по традиционной схеме разваривания под давлением (мичуринская), так и по схеме механико-ферментативной обработки зернового сырья.

4.3.2. Виноделие и производство соков

Гидролитические ферменты *Trichoderma* с пектиназной, целлюлазной, хитиназной и/или глюканазной активностями, ранняя экстракция при очистке сока винограда *Palomino fino* влияют на ферментацию и итоговую характеристику молодого вина. Эффект ферментного препарата при очистке сока зависел от санитарного состояния винограда (здоровый или инфицированный) и от использованной системы получения сока (замороженный или свежий виноградный сок). Наибольшая эффективность показана при использовании ферментов в зараженном соке. Ферментные препараты не влияли на кинетику ферментации, хотя отмечено снижение мутности (ниже 20 NTU). Также наибольшая разница в характеристике вина отмечена при сравнении вин из соков, подверженных разным условиям (здоровые или инфицированные, замороженные или свежие) в зависимости от использованных ферментов. Ранняя экстракция соков привела к получению вин с повышенной кислотностью и высших спиртов: метанол, пропанол и изобутанол (Roldán et al., 2005).

Виноделие само по себе представляет биотехнологический процесс, в котором фермент и дрожжи играют фундаментальную роль. Попытки улучшить дрожжевые штаммы, используемые в ферментации виноградного сока, не прекращались в течение десятилетий, с другой стороны последние 30 лет применение экзогенных микробных ферментов развивалось очень медленно. Их использование в определенной степени сдерживается недоверием виноделов и потребителей. Тем не менее, наши знания о макромолекулярном составе винограда, суслу и вина значительно пополнились, так же, как и наше понимание того, каким образом ферменты могут улучшить сам процесс и качество конечного продукта (Galante et al., 1998).

В виноделии в основном используется три экзогенных препарата: пептиназы, β -глюканазы, гемицеллюлазы (Roldán et al., 2005). Данные ферменты так же используются при мацерации оливок и при производстве плодово-ягодных соков. Недавно β -гликозидазы стали использовать для улучшения ароматических свойств продуктов из гликолизированных предшественников. Преимущества использования ферментов выражается в лучшей мацерации кожицы, в улучшении экстракции пигментов, в лучшем осаждении осадка и фильтрации, в улучшении качества вина, в увеличении стабильности фермента. Пептиназы из штаммов *Aspergillus* spp. были первыми микробными ферментами, использованными в винодельческих хозяйствах. Пептины представляют собой гетерогенную группу полисахаридов, локализованных в среднеламинарной и первичной мембране кожицы ягод винограда. Они играют важную роль в созревании ягод, но оказывают неблагоприятные воздействия на эффективность прессования ягод, на количество суслу, цвет, прозрачность и фильтрацию. Коммерческие препараты пектиназ состоят из различных доз пектинэстеразы, а так же некоторых деполимераз (полигалактонуроноазы и пектинлиазы). Препараты *Aspergillus* spp. содержат минорные компоненты гемицеллюлаз, которые деградируют нейтральные пектины, ассоциированные с гемицеллюлозами, и содержат целлюлазы, которые атакуют клеточную стенку. Природа так называемых побочных активностей, их соотношение до сих пор не исследованы хотя считается, что они играют критическую роль в достижении оптимальных характеристик ферментной технологии в виноделии. Использование препаратов пектиназ, которые добавляют во время раздавливания ягод или прямо в сусло, улучшает экстрактивность, укорачивает этап осветления и увеличивает содержание терпенов в вине. Предпочтительнее используются препараты с высоким содержанием пектинлиазы и низким содержанием пектинметилэстеразы, так как в этом случае количество метанола, образующегося из метилированной полигалактуроновой кислоты, сводится к минимуму (Galante et al., 1998).

Все эффекты описать невозможно по причине множества сортов винограда, сезонных изменений и технологий, так как все эти факторы влияют на результат. В общем пектиназы позволяют достичь лучшего осветления и увеличить скорость фильтрации. Однако эти ферменты оказывают некоторые ограниченные эффекты на неустойчивые суслу или вина и на качество вина. Впервые, в начале 1980-х годов (цит. по Galante et al., 1998) было показано, что β -глюканаза *Trichoderma* может быть успешно применена в производстве вина из винограда, инфицированного *Botrytis cinerea*. Эта плесень обычно атакует виноград в начале созревания при определённой температуре и влажности, что приводит к образованию высокомолекулярных коллоидных полисахаридов (которые неправильно относят к декстранам), из-за которых вино трудно фильтруется. Стало известно, что *Botrytis cinerea* производит растворимые полисахариды, которые являются β -1,3-глюканами, с короткими цепями, связанными β -1,6-гликозидными связями. Этот глюкан специфично гидролизуется под воздействием очищенной β -глюканазы, полученной из селекционного штамма *Trichoderma harzianum*. Штамм был запатентован, и коммерческий препарат был поддержан европейской комиссией в 1995 году для использования в виноделии после алкогольной ферментации (Novo Nordisk). Было отмечено, что обработка вина β -глюканазой *Trichoderma* приводит к гидролизу других глюканов, выделенных дрожжами, которые так же вызывают серьёзные проблемы при осветлении и фильтрации вина.

Исследования и характеристики применения мацерирующих ферментов в начале 1980-х годов (препараты с различными активностями целлюлаз, пектиназ, гемицеллюлаз) привели к значительному улучшению процессов давления винограда (получения суслу), получения суслу - самотёка и увеличению общего объёма суслу. Показано, что добавление пектиназы не оказывало негативных эффектов на качество сока и вина. Значительное улучшение технологии получения белых и красных вин может быть достигнуто только путём применения препаратов, содержащих правильные соотношения экзогенных пектинолитических, целлюлолитических и гемицеллюлолитических активностей, восполняющих низкую активность данных ферментов винограда. Этот баланс может быть установлен в экспериментах с использованием различных смесей ферментов и различных сортов винограда. В оптимальных условиях значительные улучшения могут быть достигнуты в процессах получения суслу – самотёка, сока, качества сока и вина (в том числе ароматических свойств), а так же в общей производительности процесса (Galante et al., 1998).

Используя препарат мацерирующих ферментов (смесь активностей из *Trichoderma* и *Aspergillus*, которая содержала пектиназы, целлюлазы и гемицеллюлазы в соотношении 80:70:55 под коммерческой маркой Cytolase 219TM), группа авторов добилась позитивных результатов в опытах проведённых в течение 4 сезонов 1989-1992 года в северной Италии на культурах белого винограда (Soave, Chardonnay, Sauvignon). Фермент добавляли в давилку в дозах 40-100 мг/кг и инкубировали смесь в течение 1-4 часов при температуре 0-35⁰С. Трудно определить точный состав препарата мацерирующих ферментов, так как все коммерческие препараты содержат минорные активности. Использование Cytolase 219TM на виноградниках различных стран показало значительное улучшение качества продукта: улучшение экстракции пигментов красного винограда, увеличение экстракции ароматических веществ как из красного, так и белого винограда, получение вкусовых качеств продукта. Увеличение экстракции пигментов из кожицы, особенно на сортах красного винограда, было повышено на 20-150% в зависимости от времени контакта препарата с кожицей винограда, температуры процесса, дозы фермента и сорта винограда, и было связано со снижением образования коричневого осадка в течение производственного процесса и при выдержке вина (Galante et al., 1998).

Использование мацерирующих ферментов в виноделии привело к расширенному применению ферментной технологии в производстве фруктовых соков. В производстве

сока яблок и персиков целые фрукты разрушаются для получения массы, которая после механической обработки (прессование, центрифугирование, фильтрование) разделяется на прозрачную жидкость (сок) и твёрдую фазу (жмых). Общий объём и общая производительность увеличивается при добавлении ферментов, что не требует капитальных инвестиций в новое оборудование. Мацерирующие ферменты используются на двух этапах этого процесса. (1) После разрушения плодов ферменты используют для обработки массы для лучшего разделения сока и жмыха. Это приводит к увеличению объёма сока и уменьшает время, необходимое для экстракции разных компонентов. (2) При обработке сока происходит его осветление, снижается вязкость, увеличивается скорость фильтрации и улучшается стабильность конечного продукта. Использование мацерирующих ферментов является очень привлекательным при производстве различных субпродуктов из цитрусовых. При разделении сока из цитрусовой массы, например, использовался препарат из пектиназы и целлюлазы, который повышал количество конечного продукта и эффективность производства. Таким образом, производство из вторичных продуктов, цедры и целых фруктов с использованием ферментов *Trichoderma* для обработки массы представляет собой наиболее часто используемый экономичный процесс.

В заключение можно сказать, что использование ферментных технологий в виноделии, особенно ферментов *Trichoderma*, прибыльно и полезно. Тем не менее, для достижения успехов и для лучшего биохимического образования виноделов и потребителей необходимо дальнейшее исследование в данной области.

4.3.3. Получение оливкового масла

Олива, как и виноград, является самым старинным и значимым символом средиземноморской цивилизации. Выращивание оливок и получение оливкового масла освещается даже в греческой мифологии. Производство оливкового масла на современном этапе является промышленным производством в Италии, Испании, Греции, Тунисе и Турции, где оливковое масло является главным компонентом диеты. Эти 5 стран производят 90% мирового производства оливкового масла, лидирующее положение занимает Испания. Кроме того, производство оливкового масла увеличивается и в других странах, таких как США и Северная Европа, где оливковое масло заменяет животные и молочные жиры. Оливковое масло обладает положительными, полезными для здоровья характеристиками, так как оказывает антиоксидантное действие, снижает уровень холестерина в крови и полезно для сердечно-сосудистой системы. Только в Италии ежегодно производится 200000 метрических тонн оливкового масла (рынок в 1,2 млн. долларов). Потребители в основном предпочитают масло марки «extra virgin» (Galante et al., 1998).

Так же, как и в виноделии, пектиназы были первыми ферментами, применёнными для повышения выхода оливкового масла. Первый коммерческий препарат для этой цели Olivex[®], полученный из *Aspergillus oculus*, содержал несколько ферментативных активностей, преобладающим компонентом была пектиназа, так же в препарате находили гемицеллюлазы и целлюлазы. Этот препарат позволял получить дополнительные 10-20 кг оливкового масла на 1 тонну оливок. Объём дополнительного масла зависел от созревания оливок, температуры и дозы ферментов. После систематических исследований 1980-х годов стало очевидно, что для мацерирования оливок недостаточно одной ферментативной активности при технологической температуре. Кроме того, смеси препаратов работали лучше. Созданные новые препараты позволили улучшить производство оливкового масла из различных сортов. Самыми главными активаторами являлись пектиназы, целлюлазы, гемицеллюлазы. Пектиназы грибов сами по себе не обладали полной эффективностью.

Наиболее эффективные препараты содержали пектиназы *Aspergillus*, глюканазы и гемицеллюлазы *Trichoderma*. В успешные года, в начале каждого сезона авторы проводили полевые исследования воздействия фермента *Trichoderma* на взвесь свежих оливок. Показано, что ферменты *Trichoderma* были главным компонентом данных препаратов, но пектиназы тоже играли определенную роль (цит. по Galante et al., 1998).

Смесь ферментов добавляли в давящую или в первую смесь, что делало возможным мацерацию во время давления и перемешивания, которое отделяет водную фазу. Все исследованные смеси не содержали липолитической активности. Был использован препарат Cytolasa O из Genencor inc. Полевые исследования были проведены в центральной и южной Италии в течении сезона 1991 года. Наблюдались значительные вариации результатов, благодаря поддержке стабильных условий. Тем не менее, добавление на стадии размалывания ферментного препарата в дозе 25-50 мл на 100 кг оливок (250-500 ppm) приводило к увеличению урожая от 1 до 4 кг масла на 100 кг оливок, что было признано средним результатом. Профиль качества масла «extra virgin» улучшился. Добавление фермента не изменило в значительной степени кислотность масла и пероксидное число, тогда как общее содержание антиоксидантов (токоферолов и полифенолов) часто возрастало. Сохранность масла также увеличилась, что было показано тестом Rancimat Induction Time в лабораторных условиях. Результаты показали, что использование целлюлаз с минорными активностями гемицеллюлаз *Trichoderma* в смеси с пектиназами увеличило урожай и качество оливкового масла «extra virgin» (цит. по Galante et al., 1998).

Общие преимущества использования мацерирующих ферментов в производстве оливкового масла можно представить следующим образом:

- увеличение объёма экстрактивного материала при холодном отжиме на 2 кг масла из 100 кг оливок;
- улучшение фракционирования маслянистой жидкости;
- улучшение качества масла, увеличение антиоксидантных свойств и витамина E;
- замедление помутнения масла;
- увеличение эффективности использования растения;
- снижение содержания масла в сливных водах после производства оливкового масла (Galante et al., 1998).

4.3.4. Производство кормов

Кормопроизводство – важный компонент агробизнеса. Ежегодно производится 600 млн. тонн кормов, на 50 млрд. долларов ежегодно. Корма для птицеводства, свиноводства, крупного рогатого скота (КРС) представляют собой 90% всех кормов. Остальное приходится на рыбоводство и корм для домашних животных. Использование ферментов в кормах для животных – более современная область агробизнеса и прикладной энзимологии, хотя исследования в этой области ведутся около 50 лет. Ещё недавно кормопроизводство представляло собой наиболее растущую область промышленной энзимологии, и ферменты кормопроизводства представляли собой 30% всех ферментов в год. Если быть точным, то этот рост происходит только за счёт ферментов *Trichoderma*. Несмотря на то, что первая генерация кормовых ферментов превратилась в коммерческие продукты, в этой области появляются новые ферменты. В основном все ферменты, используемые в кормопроизводстве, являются гидролазами, которые используют для: А) элиминации или изъятия из кормов непищевых факторов, обычно присутствующих в зерне или овощах; Б) деградации компонентов зерна с целью снижения вязкости и улучшения пищевой ценности субстрата; В) добавки к пищеварительным ферментам. Например, добавляют экзогенные протеазы и амилазы, концентрация которых недостаточна во время пост-

отъемного периода, как это часто бывает с цыплятами и поросятами (Galante et al., 1998).

Рассмотрим переработку отходов сельского хозяйства, пищевой и зерноперерабатывающей промышленности в кормовые добавки и комбикорма по технологии микробиологической биоконверсии с использованием *Trichoderma*.

Технология микробиологической биоконверсии отходов может быть предназначена для переработки сырьевых компонентов, не используемых в традиционном кормопроизводстве, в высококачественные углеводно-белковые кормовые добавки и комбикорма.

Суть технологии биоконверсии заключается в следующем: сырьевые компоненты (отходы), содержащие сложные полисахариды – пектиновые вещества, целлюлозу, гемицеллюлозу и др., подвергаются воздействию комплексных ферментных препаратов *Trichoderma*, содержащих пектиназу, гемицеллюлозу и целлюлазу. Ферменты используются для расщепления сложных полисахаридов на простые с последующим построением на их основе легко усваиваемого кормового белка.

В качестве исходных сырьевых компонентов могут быть использованы следующие отходы:

Растительные компоненты сельскохозяйственных культур: стебли зерновых и технических культур, корзинки и стебли подсолнечника, льняная костра, стержни кукурузных початков, картофельная мезга, трава бобовых культур, отходы сенажа и силоса, отходы виноградной лозы и др.

Отходы зерноперерабатывающей промышленности: отруби, отходы при очистке и сортировке зерновой массы (зерновые отходы), зерновая сорная примесь, травмированные зерна, щуплые и проросшие зерна, семена дикорастущих растений, некондиционное зерно.

Отходы консервной, винодельческой промышленности и фруктовые отходы: кожица, семенные гнезда, дефектные плоды, вытерки и выжимки, отходы винограда, отходы кабачков, обрезанные концы плодов, жмых, дефектные кабачки, отходы зеленого горошка (ботва, створки, россыпь зерен, битые зерна, кусочки листьев), отходы капусты, свеклы, моркови, картофеля.

Отходы сахарной промышленности: свекловичный жом, меласса, рафинадная патока, фильтрационный осадок, свекловичный бой, хвостики свеклы.

Отходы пивоваренной и спиртовой промышленности: сплав ячменя (щуплые зерна ячменя, мякина, солома и др. примеси), полировочные отходы, частицы измельченной оболочки, эндосперма, битые зерна, солодовая пыль, пивная дробина, меласса, крахмалистые продукты (картофеля и различных видов зерна), бражка, послеспиртовая барда (Новаковская, 1973).

Отходы чайной промышленности: чайная пыль, сметки, волоски, черешки.

Отходы эфирно-масличной промышленности: отходы травянистого и цветочного сырья.

Отходы масло-жировой промышленности: подсолнечная лузга, хлопковая шелуха.

Отходы кондитерской и молочной промышленности.

Таким образом, любое растительное сырье и его производные, как лигноцеллюлозный источник, доступны для биоконверсии ферментными препаратами *Trichoderma* в углеводно-белковые корма и кормовые добавки.

Наряду с переработкой кондиционных растительных и зерновых компонентов, технология позволяет восстановление и многократное увеличение прежних кормовых свойств сырья, зараженного патогенной микрофлорой, испорченного насекомыми или частично разложившегося из-за неправильного хранения.

В процессе биоконверсии в некондиционных компонентах также уничтожаются болезнетворная микрофлора и вредители. При этом кормовая ценность

некондиционного сырья после соответствующей обработки может превышать кормовую ценность кондиционных аналогов.

После завершения процесса биоконверсии получаемым конечным продуктом является кормовая добавка – углеводно-белковый концентрат (УБК).

Особенностью конечной продукции, получаемой по альтернативной технологии микробиологической биоконверсии, в основном является то, что по своей сути, сырье для производства кормовой добавки УБК проходит обработку в среде, аналогичной микрофлоре начального участка пищевода, т.е. первый этап пищеварения – «подготовка корма к перевариванию» – начинается вне пищевода. Поэтому процесс переваривания таких кормов уже непосредственно в пищеводе животных, птиц и рыбы характеризуется высокими уровнем биологических процессов и переваримостью корма, а также сниженными ферментными и энергетическими затратами организма на всем этапе пищеварения. Таким образом, получаемая кормовая добавка – УБК, отличается высокой питательностью, более легкой усваиваемостью, биологической активностью, а также ферментной, витаминной и минеральной ценностью.

Кормовая добавка УБК используется как основной компонент при производстве комбикормов в соотношении 1:1, как добавку к грубым растительным кормам, при производстве простых кормовых смесей с измельченным фуражным зерном, отрубями, зерноотходами и пр., с нормой ввода до 25...65%.

Еще в 80-х гг. Ташпулатов с соавторами (Ташпулатов и др., 1980) получали УБК с помощью *T. virens*-19 на отходах вино-консервного производства. При выращивании гриба *T. virens*-19 в оптимальных условиях на среде с гузапай, отрубями и комплексом отходов количество белка в биомассе поверхностной культуры увеличилось до 20-25%, и сохранилась исходная активность целлюлазы и ксиланазы, что повысило не только ценность белково-ферментного концентрата, но и качество силоса гузапай (табл. 4.2).

Таким образом, была подобрана наиболее дешевая и доступная среда для биосинтеза белка и активных целлюлолитических ферментов грибом *T. virens*-19.

Т а б л и ц а 4.2

Влияние различных добавок отходов консервно-овощной промышленности в среду на биосинтез белка *T. virens*

	Белок в мицелии гриба, %	Активность, ед/г		
		C ₁ -фермент	C _x -фермент	Ксиланаза
Контроль-отруби+гузапая (1:1)	14,5	51,5	95	160,8
отруби+гузапая+яблочные выжимки (5:3:2)	17,5	59	113,5	185,7
Отруби+гузапая+виноградные выжимки (5:3:2)	17	63,5	120,5	180,5
Отруби+гузапая+виноградные выжимки+яблочные выжимки (2:1:1:1)	20,5	95,5	205	185,5
Отруби+гузапая+виноградные+яблочные выжимки+солодовые ростки (4:2:2:1:1)	23,5	90	170,5	195

Введение фазы с использованием литических ферментов грибов является лучшим примером того, как можно наиболее эффективно элиминировать непищевые компоненты (миоинозитолгексафосфаты или фитаты), присутствующие в некоторых ингредиентах кормов для свиноводства, например, сою. Использование фитазы полезно для питания животных и снижает содержание фосфора в свином навозе. Коммерческие фитазы производятся, по крайней мере, двумя компаниями. Однако самое главное

использование ферментов – для деградации некрахмальных полисахаридов, таких, как β -глюкан и пентозаны, что улучшает скорость конверсии кормов (кг корма на кг живого веса) у моногастрических животных. Использование ферментов снижает риск заражения окружающей среды вокруг ферм. Такими ферментами являются β -глюканазы и ксиланазы, которые используются при приготовлении кормов на основе ячменя и пшеницы.

Пентозаны (в основном арабиноксиланы), такие, как β -глюканы, присутствуют в различных количествах в зёрнах пшеницы, ячменя, овса, тритикале и ржи и ассоциированы с клеточной стенкой клеток эндосперма. Данные полисахариды обладают высокой вязкостью и негативно влияют на перевариваемость кормов. Как следствие, присутствие высоких доз этих материалов в кормах снижает ФКК, вызывает жидкий помёт, особенно в птицеводстве. Так, пищеварительная система моногастрических животных не обладает ферментативными активностями деградации некрахмальных полисахаридов, что объясняет их низкую пищеварительную ценность. Добавление гидролизующих ферментов во время производства корма приводит к разрушению непищевых ингредиентов и помогает абсорбции всех пищевых компонентов (особенно жиров), что улучшает конверсию пищевых продуктов и привес (Galante et al., 1998).

До начала 1980-х годов было показано, что усвоение кормов на основе ячменя, содержащего β -глюканазы увеличило живой вес бройлеров. Добавление деградирующих полисахаридных ферментов в пищевую рацион кур-несушек и бройлеров может привести к повышению энергии утилизации азота и увеличивает скорость роста и эффективность потребления кормов. Считается, что положительные эффекты добавления ферментов проявляются двояко: как снижение вязкости и высвобождение пищевых веществ из эндосперма и алейроновых слоёв зерна. Вязкость считается самым главным недостатком в питании животных, поскольку вязкость связана с диффузией субстратов панкреатических ферментов и продуктов реакции. Таким образом, добавление гидролитических ферментов в диету является высокоэффективным способом снижения вязкости кормов *in vivo*. В присутствии β -глюканаз и ксиланаз в пищеварении ассимиляция питательных веществ в значительной степени усиливается. Например, некоторые преимущества применения препарата EconasaTM, приготовленного из ферментов *Trichoderma reesei*, при производстве продуктов для птицеводства можно представить следующим образом:

- большая свобода в формировании диеты;
- использование более дешёвого сырья;
- лучшая перевариваемость ингредиентов кормов;
- увеличение энергетического значения зерновых;
- улучшение роста и СКК;
- большая стандартизация животных;
- чистые яйца;
- более окрашенный желток;
- сухой помёт;
- снижение загрязнения окружающей среды.

EconasaTM – это коммерческое название Primalko Ltd, являющееся смесью ферментов ксиланазы и β -глюканазы *Trichoderma*. Каждая смесь ферментов применяется для создания кормов, содержащих разное соотношение ячменя, пшеницы или овса, хотя оптимальное соотношение ферментов рассчитывается для взрослых птиц. Известно, что старшие бройлеры требуют большей ксиланазной активности, чем куры-несушки. Так же препарат AvuzymeTM (производства Finnfeeds International) является препаратом, содержащим различные ферменты, разработанные для бройлеров, несушек и племенных кур, потребляющих ячмень, пшеницу, смесь пшеницы и ячменя. Соотношение фермента в препарате было оптимизировано для каждой композиции диеты (цит. по Galante et al., 1998).

Присутствие β -глюканов в диете КРС вызывает несколько проблем и влияет на активность микробной популяции жвачных животных. Так, взрослые свиньи менее чувствительны к глюканам, так как они претерпевают длительные превращения в их пищеварительной системе и большее растворение, снижая негативное действие на пищеварение. Тем не менее, гидролизующие ферменты, добавленные в корма, полезны для самих животных. Например, когда препарат, содержащий ксиланазу, добавляется в корм для свиней на основе пшеницы, становится очевидной зависимость ежедневного прироста от количества добавленной ксиланазы. Молодые поросята после отъёма получают пользу от добавления фермента в диету. Целлюлазы и гемицеллюлазы часто используются вместе с протеазами и амилазами, но в случае диеты, основанной на зерновых, следует правильно определять состав ферментного препарата. Finn feeds International разработан целый набор ферментных препаратов для свиноводства под названием PorzymTM (цит. по Galante et al., 1998).

Нами было проведено исследование изменения вязкости растворов ржаных экстрактов, содержащих пентозаны под действием культуральной жидкости грибов, содержащих комплекс ферментов – гидролаз. Полученные препараты штаммов *Trichoderma*, выделенных из древних захоронений на территории РТ, и промышленного штамма *T. reesei* были исследованы на способность изменения вязкости растворов, содержащих пентозаны ржи. Результаты приведены на рисунке 4.3. Исследования показали, что максимальная активность синтезированных ферментных препаратов к деструкции растворенных пентозанов получена при использовании препарата штамма Т. 2. Препарат снижал вязкость ржаного экстракта за 2,5 часа на 28,2% (Скворцов и др., 2005).

В целом результаты проведенных исследований показали высокую активность штаммов грибов *Trichoderma* к деструкции пентозанов. Отмечена сопоставимая активность грибных ксиланаз, синтезированных промышленными продуцентами и штаммами, выделенными из местных почв.

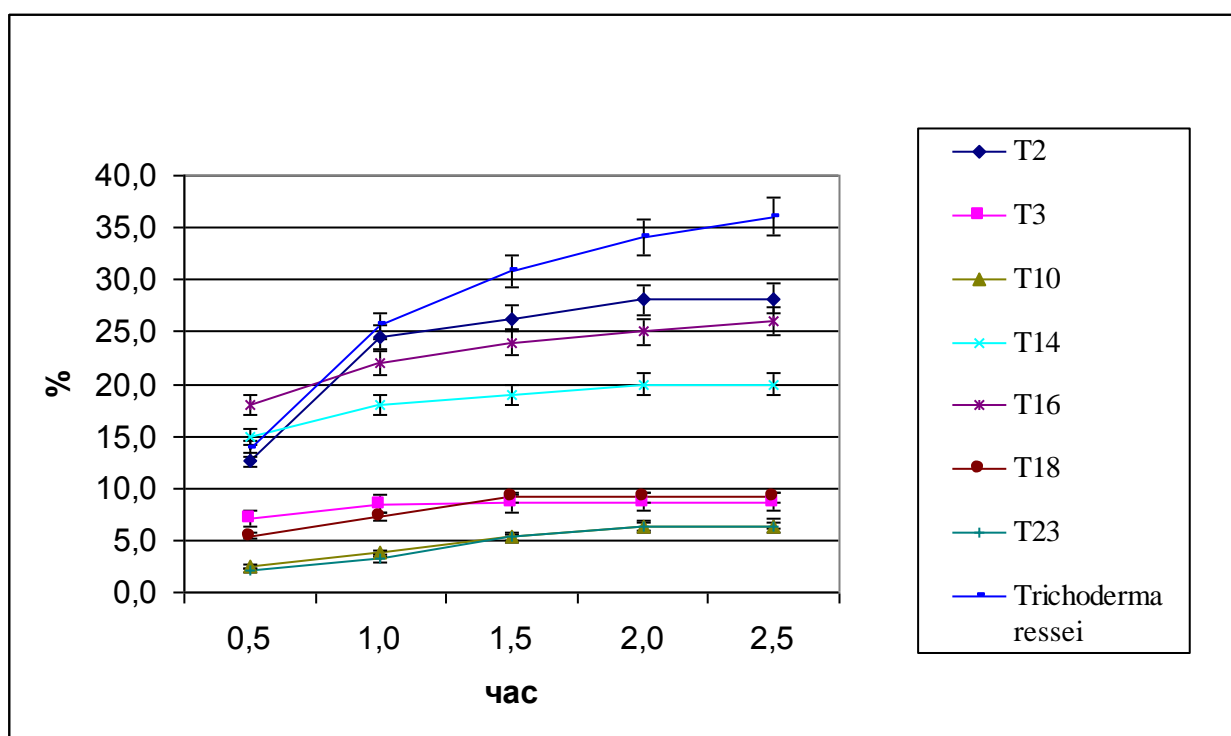


Рис. 4.3. Снижение вязкости ржаных экстрактов синтезированными ксиланазами.

Таким образом, в результате проведения скрининга грибов *Trichoderma* выявлены наиболее активные штаммы – продуценты гидролаз, выделенных из почв РТ,

Trichoderma spp. 2, *Trichoderma spp.* 14, *T. harzianum* (18). Эти штаммы были использованы при биосинтезе препаратов грибных ксиланаз. Как видно из таблицы 4.3, аборигенный изолят Т.302 показал наибольшую активность синтеза ксиланаз среди почвенных изолятов 8.82 IU/ml. Штамм Т.18, разрешенный к применению в кормах, синтезировал при культивировании 2.30 IU/ml активности ксиланаз (Скворцов и др., 2005).

Проведено сравнительное изучение активности экзогидролаз протеазы, целлюлазы и ксиланазы у грибов *Trichoderma*, выделенных на территории РТ.

Т а б л и ц а 4.3

Ферментативная активность изолятов *Trichoderma*

№ изолята	Ксиланазная активность, IU/ml	Протеазная активность, IUl-1	Целлюлазная активность, IUml-1
<i>T spp.</i> 301	-	19,3167	0,5555
<i>T spp.</i> 302	8,8173	76,1044	1,0452
<i>T spp.</i> 303	8,2469	12,7044	0,9261
<i>T spp.</i> 304	1,4448	17,6207	0,5212
<i>T spp.</i> 305	1,4315	9,6665	0,5177
<i>T spp.</i> 306	1,4455	6,8001	0,7680
<i>T spp.</i> 307	1,4829	19,0035	0,6656
<i>T spp.</i> 308	1,3171	21,5240	0,9733
<i>T.harzianum</i> (309)	1,2497	20,2664	0,8319
<i>T.viride</i> (311)	1,1054	17,0115	0,7112
<i>T spp.</i> 313	1,4676	10,8552	0,8212
<i>T spp.</i> 315	не определялась	55,5188	0,5740
<i>T spp.</i> 318	1,3307	не определялась	0,9887
<i>T spp.</i> 319	1,4527	22,1301	1,0465
<i>T.viride</i> (320)	1,6525	13,8421	0,8860
<i>T spp.</i> 321	1,7305	20,7231	0,7270
<i>T spp.</i> 322	1,4734	26,6979	0,7488
<i>T spp.</i> 323	не определялась	229,7508	не определялась
<i>T spp.</i> 324		45,8559	0,6249
<i>T spp.</i> 325		30,4294	0,6626
<i>T spp.</i> 326		16,4435	0,6619
<i>T spp.</i> 327		-	0,6020
<i>T spp.</i> 328	5,0275	22,3173	1,1986
<i>T spp.</i> 204 (1)	не определялась	12,8100	0,6037
<i>T spp.</i> 211		20,0358	0,5264
<i>T spp.</i> 2	1,67	30,0	1,31
<i>T spp.</i> 14	1,33	20,0	1,11
<i>T.harzianum</i> (18)	2,30	20,0	1,37

В препаратах, основанных на ферментах *Trichoderma*, ферменты лучше работают в кислых условиях (рН 5-6), что делает их более эффективными в верхних зонах 12-ти перстной кишки. В наших исследованиях лучшие свойства по сохранению активности проявили ксиланазы штамма *T. reesei*, причем снижение активности происходит практически пропорционально времени. Реально большая часть корма находится в желудке животных не более 5 часов, а затем переходит в кишечник. Согласно полученным данным, за 5 часов при физиологических условиях желудка ксиланазная активность полученных нами препаратов *Trichoderma* уменьшится на 40%, таким образом сохранится 60% исходной активности. Установлена высокая

стабильность ксиланаз *Trichoderma* в кислой среде рН 2, соответствующей среде желудка моногастричных животных (Скворцов и др., 2005).

Некоторые ферменты действуют в течение производства кормов и в пищеварительном тракте животных. Ферменты *Trichoderma* термостабильны (оптимальная температура 55-60°C) и остаются активными в течение производства корма. В свете современной тенденции повышения температуры таблетирования для уничтожения *Salmonella*, β-глюканызы представляют собой наиболее удобные ферменты, так как сохраняют свою активность при высоких температурах. Даже при прогревании корма они оказывают положительный эффект на усвоение кормов и морфологию пищеварительной системы бройлера. Негативный потенциальный эффект от нагревания может быть преодолен путём использования гранулированных ферментов или путём распыления жидкого препарата на гранулы (Galante et al., 1998).

Прямой гидролиз пищи экзогенными ферментами в рубце – потенциально активный способ, его механизм не совсем ясен. Значение этого способа нуждается в количественном определении из-за относительно низкой экзогенной активности гидролаз по сравнению с общей существующей активностью в рубце. В Канадском исследовательском центре изучалось взаимодействие между ферментами рубца и экзогенными ферментами при деградации волокон. Работа состояла из 11 (препарат фермента и его комбинации) x 5 (проба рН) экспериментов. Ферменты рубца были выделены у КРС, питавшегося высоковолокнистой пищей или находящегося на высококонцентрированной диете. Экзогенные ферменты – из трех промышленных препаратов, содержащих различные пропорции активных ксиланаз и целлюлаз *Trichoderma longibrachiatum*. Третий препарат, полученный Monsanto Co, имел промежуточный показатель, от целлюлазы до ксиланазы, в отличие от других двух препаратов. Препараты ферментов рубца, экзогенных ферментов (и их комбинации) были испытаны для выяснения способности к деградации растворимой целлюлазы, ксилана, и зернового силоса в диапазоне рН от 4.5 до 6.5, при температуре 39 градусов. Ферменты *T. longibrachiatum* действовали синергично с ферментами из смесей рубцовых микроорганизмов в разложенном растворе целлюлозы, ксилана и зернового силоса. Гидролиз увеличился до 35, 100, и 40% для растворенной целлюлозы, ксилана и зернового силоса, соответственно, а более очевидно было при диапазоне рН в районе 5.0 – 6.0. Синергический эффект между рубцовыми и экзогенными ферментами, увеличивающий гидролитический потенциал в пределах среды рубца, является важным механизмом, по средствам которого энзимные добавки улучшают усваиваемость пищи (Morgavi et al., 2000).

Новой развивающейся областью применения *Trichoderma* является производство кормов для домашних животных. Корма для домашних животных содержат различные ингредиенты, которые являются хорошими субстратами для ферментов. В новые корма добавляют волокна, и использование гидролаз оказывает на эти корма положительные эффекты, описанные выше. Данные ферменты могут быть использованы для снижения сахаров, которые придают коричневый цвет кормам, что улучшает внешний вид и коммерческие характеристики. Корма, содержащие много волокон, особенно полезны для взрослых собак. Наконец, следует отметить, что для изучения влияния структурных полисахаридов растений на питание КРС были разработаны трансгенные мыши, экспрессирующие микробные эндоглюканызы в поджелудочной железе. В 12-типерстной кишке появился негликозилированный активный фермент. Этот фермент обладал устойчивостью к пищеварительным протезам, модель ясно показывала возможность генерировать нежвачными животными эндогенную способность метаболизировать не крахмальные полисахариды растений. Трансгенные животные являются альтернативным подходом использования ферментов в кормопроизводстве, но они всё ещё представляют удалённую цель животноводства (Galante et al., 1998).

Наиболее применяемым препаратом в России, обладающим целлюлазно-

глюканазно-ксиланазным ферментным комплексом, является целловиридин Г20х и целловиридин 5000, получаемые культивированием *T. reesei 18.2 kk*. Характерной особенностью получения целловиридина Г20х и целловиридина 5000, производимых на основе штамма *T. reesei 18.2 kk*, является использование в качестве индуктора нативных природных субстратов, в частности солодовых проростков и отрубей. Целловиридин-В Г20х, выпускаемый ПО «Сиббиофарм», используется также для повышения продуктивности птицы и одновременное снижение себестоимости яиц и мяса. Экзогенные ферменты включают в комбикорма, содержащие трудногидролизуемые компоненты. Они катализируют гидролиз клетчатки и участвуют в расщеплении углеводов. Скармливание птице ферментных препаратов целлюлолитического и пектолитического действия позволяет увеличить в рационах долю ячменя, ржи и некоторых других кормов. Отечественные ферментные препараты по своей эффективности не уступают зарубежным аналогам и в этой связи привлекают все больше внимания животноводов (Чегодаев и др., 2004). В России выпускаются следующие ферментные препараты на основе *Trichoderma* для сельского хозяйства: для предприятий животноводства – Амилосубтилин ГЗх, Целловиридин ГЗх, Целловиридин ВГ20х.

Области применения отечественных ферментов:

Кормовые добавки (увеличение питательной ценности кормов, за счет гидролиза некрахмальных полисахаридов и белков кормов):

«Европейская диета» (пшеница/ячмень): ксиланазы, бета-глюканызы, маннанызы, ферулоил/кумароил-эстеразы, альфа-L-арабинофуранозидазы;

«Американская диета» (соя/кукуруза): пектиназы, арабиназы, галактанызы, маннанызы, альфа-галактозидазы, протеазы;

для предприятий животноводства и птицеводства предлагаются комплексы ферментных препаратов – мультиэнзимные композиции (МЭК).

Пищевая промышленность (гидролиз некрахмальных полисахаридов, уменьшение вязкости растворов, увеличение выхода целевого продукта):

Производство пива: бета-глюканызы, целлюлазы, протеазы, пектиназа.

Производство спирта: β-глюканызы, целлюлазы, амилазы, глюкоамилаза.

Производство белковых гидролизатов: протеазы.

Текстильная промышленность (изменение свойств поверхности текстильных изделий):

Льняные ткани (отделка и придание поверхности замшеподобных эффектов).

Целлюлозно-бумажная промышленность (биоотбеливание пульпы, удаление тонеров и чернил при вторичной переработке бумаги/макулатуры):

В России выпускается три типа мультиэнзимных композиций:

МЭК-СХ-1 для кормов с высоким содержанием ржи,

МЭК-СХ-2 для кормов с высоким содержанием ячменя,

МЭК-СХ-3 для кормов пшеничного типа с добавлением овса, отрубей, шротов.

МЭК – это оптимально сбалансированные комплексы ферментов, разработанные в зависимости от состава кормов и их назначения. МЭК значительно повышают переваримость и усвояемость питательных веществ комбикормов с высоким содержанием зерновых компонентов (ячменя, пшеницы, ржи, овса, пшеничных отрубей). МЭКи помогут восполнить возможный дефицит пищеварительных ферментов на ранних стадиях развития животного и при стрессе, когда выработка собственных ферментов ограничена.

МЭКи обогащают пищеварительный тракт ферментами, которые, разрушая клеточные стенки, повышают доступность содержащихся в растительных клетках питательных веществ – крахмала, жира, протеина. Устраняются «антипитательные» и ингибирующие факторы зерна, влияющие на всасывание и использование питательных веществ корма. Снижается вязкость химуса, и уровень в нем простых углеводов повышается. Таким образом, улучшается микробиологическая среда в кишечнике.

При использовании МЭК:

фактическая кормовая ценность рациона возрастает на 5-10%;

затраты корма на единицу привеса снижаются на 5-15%;

продуктивность сельскохозяйственных животных и птицы возрастает на 7-25%.

МЭКи отечественного производства адаптированы к отечественному сырью, позволяют использовать в составе комбикормов повышенное содержание зерна ржи (10-60%), ячменя разной технологической подготовки (до 60%), овса и/или отрубей (до 30%). Отечественные препараты конкурентоспособны в отношении зарубежных аналогов по эффективности действия и стоимости; обладают стабильностью действия, так как стандартизируются по нескольким ферментам; по эффективности не уступают импортным аналогам.

4.4. Применение ферментов *Trichoderma reesei* в деревообрабатывающей и бумажной промышленности

Использование ферментов для производства древесной массы бумаги резко возросло в середине 80-х гг. XX в. Основой развития ферментной технологии явилось растущее понимание механизмов ферментативной обработки целлюлозных волокон. Развитие ценообразующих технологий привело к снижению цен на ферментные препараты. Ферментные технологии особенно легко адаптировать к промышленным условиям. Однако ферментные методы должны быть конкурентоспособными по сравнению с существующими и новыми технологиями (Buchert et al., 1998).

Штаммы *Trichoderma* являются источником коммерческих препаратов, применяемых в деревообрабатывающей и бумажной промышленности (Hildén et al., 2005). Эффективность *Trichoderma*, как продуцента белков, определяется тем обстоятельством, что необходимые ферменты являются обычным эндогенным продуктом этих штаммов. Штаммы *Trichoderma* способны интенсивно деградировать углеводы древесины, особенно целлюлозу и гемицеллюлозы, но неспособны деградировать или модифицировать лигнин. По этой причине эндогенные ферменты *Trichoderma* используются для гидролиза и специфической модификации волоконных углеводов в деревообрабатывающей промышленности. Механизмы воздействия на полимерные углеводы ферментов *Trichoderma* установлены в результате интенсивных исследований. Разработаны генетические методы для получения штаммов, способных продуцировать желаемые коммерческие смеси. Установлены молекулярные структуры нескольких гидролаз *Trichoderma*. Накопленные знания позволят в будущем осуществить структурные модификации белков, катализирующих специфическую конверсию углеводов пульпы (Buchert et al., 1998).

Ферменты, воздействующие на углеводы древесной массы. Ферментами *Trichoderma* для обработки древесной пульпы и получения бумаги являются целлюлазы и гемицеллюлазы (Hildén et al., 2005). Особенно успешно используется способность гемицеллюлаз катализировать эндорасщепление, тогда как ферменты, отщепляющие боковые группы и необходимые для полного гидролиза гемицеллюлозных субстратов, не применяются для обработки пульпы и получения бумаги. Очевидно, это обстоятельство можно объяснить тем, что, скорее, олигомеры, чем нативные молекулы являются субстратами дополнительных ферментов *Trichoderma*. При модификации волокон дополнительные ферменты, способные воздействовать скорее на полимеры, чем на олигомеры, нежелательны. Можно предположить, что секреция эффективных эндоферментов в больших количествах у *Trichoderma* зависит от специфичности дополнительных ферментов, которые катализируют превращение скорее олигомеров, чем полимеров (Buchert et al., 1998).

Очевидно, что для различных целей нужны разные комбинации ферментов. Развитие методов генной инженерии позволяет осуществить специфическую модификацию профилей фермента *Trichoderma*. В литературе обсуждаются возможности, с одной стороны, полного исключения гена, а с другой стороны, суперпродукции одного или нескольких ферментных компонентов. Так, разработаны ферментные смеси, состоящие, в основном, из эндоглюканаз. Условия культивирования могут в значительной степени влиять на профиль активности. Так, высокие значения рН во время ферментации приводят к увеличению ксиланазной и снижению целлюлазной активности. Можно считать, что инженерия целлюлаз *Trichoderma* позволит получить ферменты с новыми интересными свойствами. Ферменты *Trichoderma* обладают повышенной активностью при рН около нейтрального и температуре около 50°C. Установлено, что ксиланазы *Trichoderma* имеют более высокий оптимум рН на древесных субстратах, чем ранее считалось. Однако, позднее было показано, что это артефакт, возникающий благодаря эффекту Доннана, и все еще следует доказать, можно ли успешно изменять оптимум рН и температуры ферментов. Если это так, то некоторые недостатки ферментов могут быть преодолены, поскольку существующие оптимумы рН и температуры ферментов *Trichoderma* ограничивают применение этих ферментов в деревообрабатывающей и бумажной промышленности (цит. по Buchert et al., 1998).

По причине низкой подверженности древесных стружек к энзиматической модификации, ферментативный этап обработки пульпы успешен только после первичного механического расщепления стружек и, таким образом, применение ферментов приводит к экономии энергозатрат, которые исчислены как 20% для СВН и 5% для гемицеллюлаз (маннаны и ксиланазы). Интересно, что положительные результаты экономии энергозатрат были установлены в случае использования смеси целлюлаз. Когда измельчение проводилось в присутствии СВН, экономия энергии составила 30-40%. Эти данные, полученные в лаборатории, были подтверждены в пилотных исследованиях, в которых было показано, что измельчение 900 кг стружек, обработанных СВН I до вторичного измельчения, привело к экономии энергии в размере 10-15%. Обработка СВН не влияла на дальнейшее качество пульпы. Увеличение индекса натяжения можно объяснить воздействием СВН. Хорошие оптические свойства продукта также наблюдали после обработки СВН (Buchert et al., 1998).

Ферментативное беление обработанной готовой пульпы представляет собой первое промышленное применение ферментов в бумажной промышленности. Идея применения гемицеллюлаз для повышения свойств химических отбеливателей появилась в начале 80-х гг. XX в. Концепция ферментативного беления была основана на том наблюдении, что ограниченный гидролиз гемицеллюлозы в пульпе под воздействием гемицеллюлаз, в основном ксиланаз, увеличивало экстрактивность лигнина из готовой пульпы в результате последующих этапов беления. Предварительная обработка ксиланазой при низкой дозе хлора во время беления готовой пульпы позволяет снизить содержание хлорорганических материалов в готовом продукте. Первые промышленные опыты были предприняты в 1988 г. в Финляндии через короткое время после сообщения, что было возможным, поскольку не трудно производить ксиланазы *Trichoderma* в промышленном масштабе. Так как обработка ксиланазой представляет собой эффективный и легко предваряемый процесс, ксиланазы по сегодняшний день используются в различных предприятиях до хлора или же вместо хлора для беления готовой пульпы. Эффект гемицеллюлаз в белении основан на модификации гемицеллюлоз пульпы, который облегчает выход лигнина при химическом белении. Главный фермент, увеличивающий белизну пульпы, – это эндоксиланаза. Эффект ксиланаз не зависит от происхождения фермента. Показано, что как грибные, так и бактериальные ксиланазы увеличивают белизну

пульпы. Установлено, что маннаназы *T. reesei* сама по себе или в комбинации с ксиланазой увеличивает способность древесной массы к белению. Свойства маннаназы зависели от источника данного фермента. Обработка ксиланазой пульпы для экономии энергии предпринята также и в процессе беления газообразным хлором и в процессе беления кислородными отбеливателями (Buchert et al., 1998).

Гемицеллюлазы *Trichoderma* в процессе беления. Роль ксиланазной активности в процессе делигнификации сосновой пульпы интенсивно изучали с помощью очищенной ксиланазы *T. reesei*. Показано, что ксиланазы *Trichoderma reesei* имеют различные значения рН, оптимума рН и субстратную специфичность. Однако только две ксиланазы *T. reesei* (рН 5,5 и 9), катализирующие ограниченный гидролиз ксиланов в сосновой пульпе, оказали действие, сопоставимое с химической лигнификацией при сравнении снижения числа каппа и яркости. Очищенные гемицеллюлазы *Trichoderma* использовали в опытах для проверки беления различных типов пульпы. Ксиланазы *T. reesei* были особенно эффективны на высушенной воздухом пульпе и эффект проявлялся более всего на пульпе, произведенной из северной сосны. Похожие результаты относительно роли происхождения древесной массы и методы производства этой массы на эффект ксиланаз были установлены в случае очищенного коммерческого препарата ксиланазы из различных источников. Показано, что маннаназы *T. reesei* и *T. harzianum* эффективны в том случае, когда используются до делигнификации с помощью перекиси водорода или хлорорганического беления. Наиболее выгодное использование маннаназы в белении пульпы предложено в комбинации с ксиланазой. Дополнительные ферменты, такие как β -ксилозидаза и α -арабинозидаза, играли незначительную роль в ферментативном белении пульпы. Показано, что среди индивидуальных целлюлаз только эндоглюканаза I из *T. reesei* увеличила степень беления пульпы благодаря каталитической активности в отношении с ксиланом. Большинство коммерческих препаратов гемицеллюлаз, предназначенных для беления пульпы, получено из *T. reesei* (Buchert et al., 1998).

Коммерческий препарат Pergalase А-40, содержащий целлюлазы и гемицеллюлазы *Trichoderma*, используется на различных бумажных предприятиях для производства писчей бумаги и печатного картона, оберточного материала. Возможность улучшения скорости дренажа возвращенных в цикл волокон с помощью смеси целлюлаз изучалась в конце 80-х гг. Эндоглюканазная активность является обязательным условием для дренажного улучшения рециклированной пульпы. Считается, что данного эффекта можно достичь с помощью очищенного или частично очищенного комплекса целлюлаз *Trichoderma*. Показано, что эндоглюканазы 1 и 2 одинаково эффективно снижают значение SR рециклированной готовой пульпы из мягкой древесины, что выражается как улучшенный дренаж, тогда как целлобиогидролазы не оказывают этого эффекта. Обработка ксиланазой и маннаназой незначительно улучшает значения SR (Buchert et al., 1998).

Разработка процессов энзиматической модификации волокон требует полного понимания действия разных ферментов на различные типы пульп. Исследовался коммерческий вклад препарата смеси целлюлаз *Humicola insolens* под маркой Novozyme SP 342 в обработку на различные стадии волокон из готовой пульпы. Установлено, что обработка целлюлазой снижает разобщенность волокон, что приводит к снижению грубости волокон. Четыре целлюлазы *T. reesei* по-разному воздействовали на пульпу. Установлено, что целлобиогидролазы оказали весьма средний эффект на вязкость пульпы, тогда как эндоглюканазы значительно снизили вязкость даже при низких дозах фермента. Похожие результаты были получены при обработке монокомпонентным препаратом целлюлаз неосветленной пульпы для беления. Показано, что эндоглюканаза 2 снижала вязкость более резко, по-видимому, целлобиозы не повреждали структуры волокон, но эндоглюканаза 2 атаковала целлюлозу по сайтам, гидролиз которых даже на низком уровне приводил к резкому

снижению вязкости и значительному ухудшению индекса натяжения. Предварительная обработка пульпы целлюлозой 1 и 2 практически не оказала влияния на свойства массы, тогда как эндоглюканаза 2 увеличила осветляемость массы (Buchert et al., 1998).

Хильден с соавторами (Hildén et al., 2005) оценили обработку эндоглюканазами Cel5A *T. reesei* и *Aspergillus sp.* (Novozym 476TM из Novozyme A/S) поверхности волокон древесины твердых и мягких пород. По мнению авторов, корреляция между параметрами ферментной кинетики и механическими свойствами бумаги, полученной из соответствующей массы, должна позволить быструю оценку грубоволокнистых материалов, используемых для производства бумаги.

Осветление рециклированных волокон. Применение ферментов в процессе осветления интенсивно изучалось в лабораториях и в пилотных исследованиях в последние годы. Существуют два принципиальных подхода к использованию ферментов для осветления бумажных отходов: 1) используются липазы для гидролиза красителя, 2) используются специфические углеводгидролизующие ферменты, такие как целлюлазы, ксиланазы или пектиназы для высвобождения красителя с поверхности волокна. Гидролиз носителя пигмента приводит к высвобождению индивидуального красителя – частиц черного углерода, которые слишком малы, чтобы эффективно осаждаться. В большинстве случаев предлагается использовать целлюлозы и гемицеллюлозы, когда допускается частичный гидролиз углеводов на поверхности волокна для удаления чернил (Buchert et al., 1998).

Одним из преимуществ ферментного выведения пятен является возможность отказаться от щелочных химических веществ. Осветление при низких значениях pH предотвращает щелочное пожелтение бумаги. В промышленном масштабе использования ферментов для осветления ставит своей целью снизить затраты на химические вещества и уменьшить воздействие на среду. Бумажные остатки в виде упаковки и газет подвергаются ферментативному осветлению при низком pH во многих лабораториях. Результатом этих исследований является доказательство того, что целлюлозы и гемицеллюлозы увеличивают яркость и чистоту бумажной массы по сравнению с традиционным осветлением. Ферментативное осветление также изменяет распределение частиц чернил, очевидным образом снижая размер частиц. Кроме вымывания чернил, ферментативное осветление может улучшить механические свойства бумаги (прочность) и снизить опушенность. Увеличение прочности также наблюдали в случае применения только ксиланаз, тогда как целлюлозы более эффективно увеличивали яркость и гладкость бумаги (Buchert et al., 1998).

4.5. Получение чужеродных белков с помощью *Trichoderma*

Примеры получения чужеродных белков *T. reesei*. В отличие от грибов *Trichoderma*, экспрессия чужеродных белков у других плесневых грибов, таких, как *Aspergillus* является достаточно редким событием. Можно привести два примера белков коровьего химозина и Fab-фрагментов мышинных антител, получение которых изучено в деталях. Исследования показали, что *Trichoderma* является устойчивым носителем чужеродных генов. Установлено, что в результате суперпродукции как собственных, так и чужеродных белков можно получить несколько граммов протеинов в литре культуральной жидкости, что свидетельствует о стабильности промотора гена *cbh1*. Однако уровень продукции белков более удаленных организмов, как правило, ниже (Penttilä, 1998). Однако обещающим подходом в этом случае также является метод сшивания (рис.4.4).

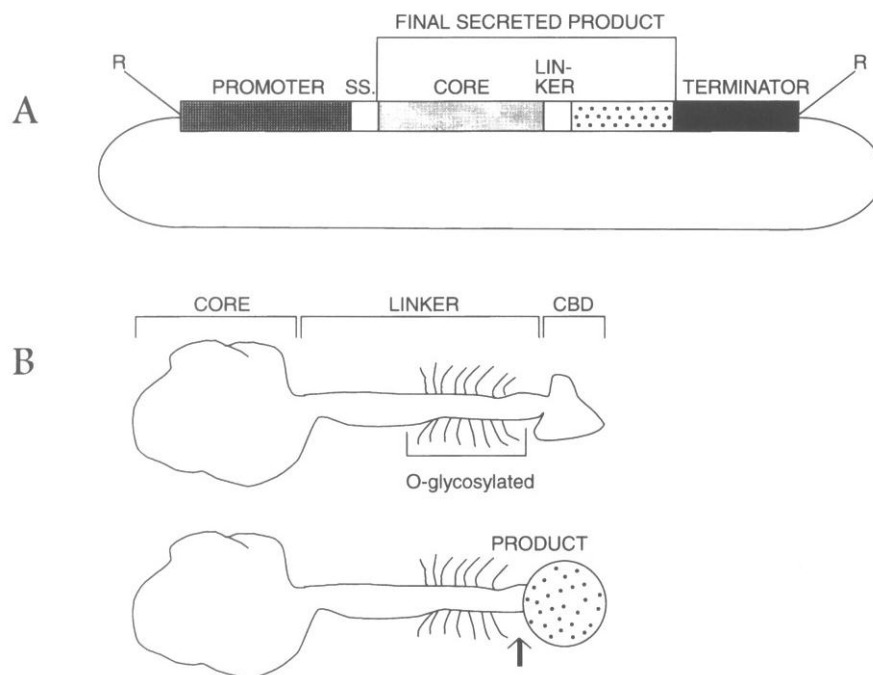


Рис.4.4. (А) Схематическое изображение экспрессионной кассеты для получения чужеродного белка путем сшивания генной конструкции с частью гена, кодирующего каталитический домен и линкер СВН1. Экспрессионная кассета состоит из части гена *cbhl*, включающей промотор, сигнальную последовательность (SS) и всю область гена, за исключением области, помеченной точками, которая кодирует чужеродный белок. Экспрессионная кассета содержится в плазмиде, из которой высвобождается путем рестрикции специфических рестрикционных сайтов (R) при условии направленной интеграции и замещения локуса *cbhls* в геноме гриба. (В) Схематическое изображение нативного белка СВН1 и сшитого белка. Черная стрелка обозначает возможный сайт протеолитического отделения целевого продукта из составной конструкции (рис. адаптирован из Penttilä, 1998).

Опыты с коровьим химозином. Коровий химозин был первым чужеродным белком, который экспрессирован в *T. reesei*, и представлял собой первый трансгенный коммерческий продукт животного происхождения, полученный с помощью плесневых грибов *Aspergillus*. Химозин синтезируется в виде незрелого полипептида, который расщепляется путем автокатализа при низких значениях pH. Зрелый химозин можно выделить из культуральной жидкости грибов.

Т а б л и ц а 4.4

Секретируемые чужеродные белки, продуцируемые *T. reesei* (Penttilä, 1998)

Белок	Источник	+ СВН1 +линкер	Уровень секреции
Лигнин пероксидаза	<i>Phlebia radiata</i>		-
Лакказа	<i>Phlebia radiata</i>	-	3 (20) мг
Глюкоамилаза Р	<i>Hormoconis resinae</i>	-	0,7 мг(х г)
Фитаза	<i>Aspergillus niger</i>	-	2г
Кислая фосфатаза	<i>Aspergillus niger</i>	-	0,5 г
Эндохитиназа	<i>Trichoderma</i>	-	150 мг (Хг)
Химозин	Корова	+	20-40 мг > 100 мг
Fab фрагменты антител	Мышь	+	1 мг (1мг) 40мг (150 м)
Антитела одна цепь	Мышь	-	1 мг
Интерлейкин-6	Млекопитающие	+	5 мг

Следовательно, для получения оптимального белка при помощи метода сшивания не нужно было добавлять протеазу.

Во всех случаях использовали промотор гена *cbhl*, за исключением одноцепочечных антител, для получения которых использовали промотор гена *gpd A. niger* (табл. 4.4). Количество продукта в скобках обозначает уровень, достигнутый в биореакторах. Первые экспрессионные кассеты для получения химозина были получены путем сшивания участка гена СВН1 с геном прохимозина или для сравнения с геном препрохимозина (с сигнальным сиквенсом химозина). Кассеты содержали промотор *cbhl* штамма RutC-30 *Trichoderma reesei*. Поскольку трансформация происходила в результате интеграции разного количества копий экспрессионной кассеты в грибной геном, сравнительный анализ уровня экспрессии был основан на анализе различных трансформантов. Высокий уровень экспрессии наблюдали в случае содержания в кассете сигнальной последовательности гена *cbhl*. Уровень экспрессии был увеличен, когда 20 аминокислотных остатков кодирующего района СВН1 были сшиты с прохимозином. Далее было показано, если сшить прохимозин с основным доменом СВН1 с помощью линкера, то продуктивность процесса возрастает в 5 раз. Штаммы, полученные таким образом, продуцировали 100 мг/л активного химозина при культивировании грибов в колбах со встряхиванием (Penttilä, 1998).

Анализ внутриклеточного и внеклеточного химозина показал, что сигнальная последовательность и химозин созревают правильно, автокатализ приводит к образованию зрелого химозина уже внутри клеток.

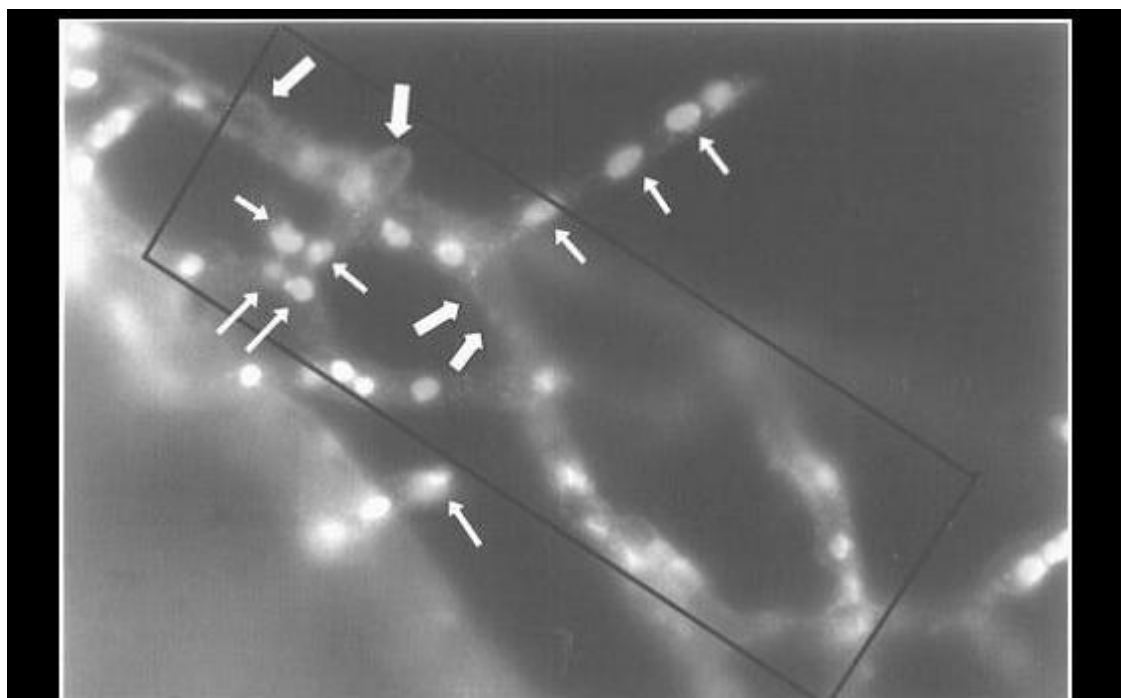


Фото 4.5. Иммунофлюоресцентная микрофотография гифов *T. reesei*, продуцирующих коровий химозин. Химозин показан широкими стрелками, ядра помечены тонкими стрелками (фото адаптировано из Penttilä, 1998).

Сравнительный анализ влияния условий среды показал, что существует корреляция между значением pH и продукцией химозина. Значения pH среды, обеспечивающей хороший рост грибов, были низкими и оптимальными для получения зрелого химозина в наибольших количествах. В среде с сывороткой и пептоном продукция химозина снижалась, вследствие деградации под воздействием протеаз гриба, что не наблюдалось в среде на основе целлюлозы (цит. по Penttilä, 1998).

Первые результаты, полученные с *T. reesei*, показали, что производство химозина с помощью грибов превосходит все другие системы. Продукция химозина в *E. coli* не была успешной, поскольку незрелый химозин аккумулировался во внутриклеточных тельцах. Уровень секреции активного химозина клетками дрожжей *S. cerevisiae* был значительно ниже по сравнению с уровнем секреции белка клетками *T. reesei*. Уровень секреции у *A. nidulans* был также невысок. Высокий уровень секреции химозина *T. reesei* сделал возможным получение мутантных форм химозина для исследования зависимости структуры и функции. Анализ 10-15 трансформантов (полученных методом сшивания с геном СВНІ) позволил выявить несколько клонов, продуцирующих 5-20 мг/л зрелого химозина. Полученное количество было достаточным для биохимического исследования и кристаллизации белка. Кристаллизация химозина, полученного с помощью *T. reesei*, доказала аутентичность продукта (цит. по Penttilä, 1998). Возможно, что эта стратегия обеспечивает интеграцию в более удачный локус грибного генома, что приводит к хорошей экспрессии как трансформирующего маркера, так и химозина. У одного из трансформантов кассета химозина заменила локус *cbh1*. Было бы интересно увидеть, какой уровень продукции, может быть достигнут, если экспрессионная кассета, содержащая шитый сиквенс, состоящий из части гена *cbh1* и гена химозина, заменит полностью локус *cbh1*. На фото 4.5 показано, как химозин ведет себя, в отличие от СВНІ, и каким путем попадает в культуральную жидкость. Иммуноэлектрономикроскопическая морфометрия показала различное внутриклеточное распределение СВНІ и химозина. Метка СВНІ в 5 раз меньше наблюдалась в клеточной стенке, чем в цитоплазме, тогда как содержание метки химозина в клеточной стенке в 22 раза превышало содержание метки в цитоплазме. Если химозин был шит с доменом СВНІ, содержание метки шитого белка в клеточной стенке снижалось. Данные свидетельствовали о том, что домен СВНІ может облегчать транслокацию химозина через клеточную стенку (цит. по Penttilä, 1998).

Опыты с антителами. Существует значительный интерес к производству молекул антител, сохраняющих антигенный участок, но лишенных других цепей антител. Fab-фрагменты состоят из двух легких цепей и двух тяжелых Fd-цепей. Легкие и тяжелые цепи связаны дисульфидными мостиками (рис. 4.6). Из всех типов молекул антител, производимых с помощью *Trichoderma*, Fab-фрагменты изучены более всего. Для получения Fab-фрагментов с помощью *T. reesei* были сконструированы экспрессионные векторы для легких цепей и для тяжелых Fd-цепей. Обе цепи экспрессировались под контролем промотора *cbh1* и сигнальной последовательности гена *cbh1* для прямой секреции. Штамм RutC-30 прежде всего был трансформирован геном легкой цепи, для облегчения селекции трансформантов в качестве маркера был введен ген устойчивости к флеомицину. Почти из ста полученных клонов только два экспрессировали легкие цепи. В двух трансформантах экспрессионная кассета интегрировалась в локус *cbh1*, что привело к его инактивации. Результаты показали, что определяемый уровень экспрессии наблюдался только в тех случаях, когда кассета интегрировалась в локус *cbh1*, а эндогенная активность СВНІ, в норме секреторирующаяся в высокой концентрации, отсутствовала. Полученные трансформанты секретировали 0,2 мг/л легких цепей в качалочных колбах (условия с принудительной аэрацией). Штамм, продуцирующий легкие цепи, был трансформирован экспрессионным вектором Fd-фрагмента, содержащим маркер трансформации *amdS*. Некоторые трансформанты секретировали функционально активные Fab-фрагменты в концентрации 1 мг/л в качалочных колбах. Иммунологические характеристики полученных фрагментов свидетельствовали о том, что две цепи созревали и соединялись правильно. Интересно отметить, что уровень секреции легких цепей штаммов возрос после трансформации его вектором тяжелой цепи (цит. по Penttilä, 1998).

Для того чтобы исследовать, как сшивание с СВНІ влияет на продукцию антител, СВД целлюлазы был заменен тяжелой цепью Fd. Полученная генная конструкция использовалась для трансформации штамма, секретирующего легкую цепь. Лучший полученный трансформант секретировал 40 мг/л иммунологически активных молекул СВНІ-Fab в культуральную жидкость. Культивирование штамма в биореакторе привело к увеличению уровня секреции до 150 мг/л, тогда как уровень секреции штамма только Fab-фрагментов достигал 1 мг/л (цит. по Penttilä, 1998).

Анализ очищенных молекул антител, продуцируемых *T. reesei*, показал, что сигнальные последовательности можно правильно отделить от легких и тяжелых Fd-цепей. В случае молекул СВНІ-Fab получены интересные результаты. Fab-фрагменты отщеплялись от фрагмента целлюлазы под воздействием неидентифицированной грибной протеазы, которая отделяла две аминокислоты с N-конца от Fd-фрагмента. Это расщепление можно продемонстрировать *in vitro* с помощью α -химотрипсина. Нерасщепленные молекулы СВНІ-Fab на 5-12 мин были менее иммунореактивны, чем идиотипические Fab-фрагменты, приготовленные из IgG антител. После отщепления СВНІ Fab-фрагменты восстанавливали иммунореактивную активность и аффинность к антигену (цит. по Penttilä, 1998).

Разделение отдельных цепей неденатурирующим электрофорезом показало, что секретируемые легкие цепи были соединены с тяжелыми цепями. Однако анализ супернатанта культуральной жидкости штамма, секретирующего молекулы СВНІ-Fab, показал, что в культуральной среде содержится 800 мг/л фрагмента целлюлазы, состоящего из каталитического домена и линкера. По-видимому, обнаруженные фрагменты были образованы из молекул СВНІ-Fd после расщепления грибной протеазой. Расщепление частично происходило внутри клеток, что было впоследствии

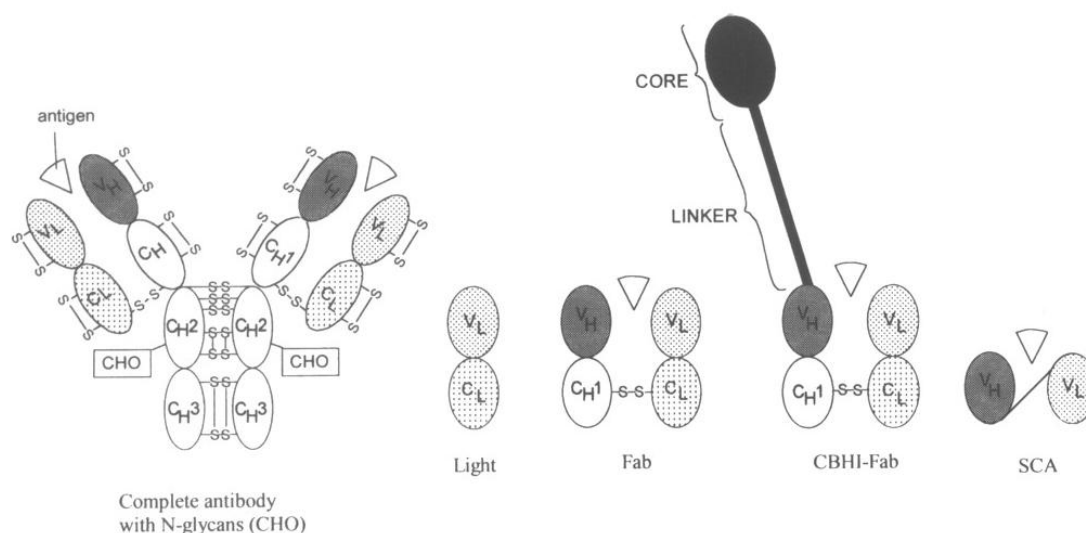


Рис. 4.6. Схематическое изображение полной молекулы антитела и укороченная форма антитела, продуцированная в *T. reesei*. Связь от СВНІ была использована в SCA молекуле (рис. адаптирован из Penttilä, 1998).

подтверждено методом мечения *in vivo*. Такое большое количество каталитического домена рождает вопрос: будет ли предотвращение внутриклеточного расщепления увеличивать уровень секреции СВНІ-Fab? Результаты, полученные с различными штаммами, которые продуцировали антитела, также показали, что секреция легких цепей может быть ограничена и сшивание их с СВНІ выгодно.

Предварительные данные свидетельствовали о том, что можно получать Fab-фрагменты, если в одной генной конструкции совмещать легкие цепи и Fd-тяжелые цепи (цит. по Penttilä, 1998).

Одноцепочечные антитела (ОА) представляют собой генно-инженерные конструкции, в которых антиген-связывающий участок легкой и тяжелой цепей связаны линкером и секретируются в виде одной молекулы. В этом случае не требуется сборка молекулы, поэтому ОА молекулы являются идеальным инструментом для изучения роли сшивания с СВНІ. Показано, что *Trichoderma* секретирует иммунологически активные ОА, но в настоящее время ОА не производят с помощью метода сшивания с СВНІ. Уровень секреции ОА 1 мг/л был достигнут обычным методом (цит. по Penttilä, 1998).

Анализ факторов, вызывающих различия в продукции антител. Различия уровня продукции Fab-фрагментов не связаны со стабильностью молекул в культуральной жидкости. Между разными молекулами антител должны быть различия поведения внутри клетки, разные скорости секреции. По этой причине был предпринят steady-state анализ количества мРНК, внеклеточных и внутриклеточных белков. Все показатели были соотнесены с уровнем экспрессии некоторых эндогенных генов и уровнем белков, таких, как целлюлаза EGI. У не трансформированного штамма уровень образования СВНІ примерно соответствовал уровню целлюлазы EGI. При подсчете секреции легких цепей было установлено, что после транскрипции экспрессионной кассеты что-то определенно мешает дальнейшим процессам, особенно продуцентам легких цепей. В этом случае секретируется в 1000 раз меньше белка, чем содержится мРНК, по сравнению с целлюлазой. Как отмечалось ранее, введение вектора тяжелой цепи в штамм, ранее трансформированный вектором легкой цепи, приводило к увеличению секреции легких цепей и в 10 раз увеличило продуктивность продуцента Fab-фрагментов по сравнению с продуцентом только легких цепей. Сшивание СВНІ-Fd оказывает значительный эффект на уровень продукции легких цепей, то есть на соотношение белка и мРНК, как и в случае целлюлаз (цит. по Penttilä, 1998).

Для получения Fab-фрагментов необходима сборка легких и тяжелых цепей. Данные показывают, что изменение продуктивности тяжелых цепей сразу оказывает влияние на продуктивность легких цепей. По-видимому, фолдинг и сборка цепей важны для секреции, а сшивание с СВНІ оказывает положительный эффект. Кроме того, СВНІ играет роль носителя, облегчающего секрецию. Проникновение в каналы ЭПР также может быть узким местом продукции антител, что подтверждается наблюдением: легкие цепи с немного увеличенным молекулярным весом, возможно, благодаря оставшейся сигнальной последовательности, обнаруживаются внутри клеток штаммов, продуцирующих только легкие цепи. Эти большие молекулы реже встречаются у продуцентов Fab-фрагментов и в зрелой форме встречаются у штаммов продуцентов СВНІ-Fab. Мечение белков S-метионином *in vivo*, иммунопреципитация и двумерный электрофорез, изучение кинетики трансляции и секреции позволили нам разделить различные внутриклеточные зрелые формы белков. На основании этого анализа было определено, что среднее время синтеза всей молекулы СВНІ составляет примерно 4 мин и среднее время секреции в культуральную жидкость составляет 10 мин. При определении этих показателей для СВНІ-Fd и СВНІ-Fab молекул у штаммов *T. reesei* были обнаружены отличия от показателей СВНІ. Предварительные результаты свидетельствовали о том, что внутриклеточная локализация полной цепи СВНІ-Fd и СВНІ-Fab не сопоставима с СВНІ при сравнении количества аминокислотных остатков, но скорость секреции зрелых молекул не очень отличается. Поскольку полученные отличия не свидетельствуют о разной скорости трансляции, то ясно, что существуют отличия в скорости транслокации и/или фолдинга. Данные о возможном медленном фолдинге молекул антител свидетельствуют о том, что экспрессия этих молекул у *T. reesei* индуцируется внутриклеточным сигнальным путем.

Это так называемый «открытый белковый ответ», о котором судят по повышенному уровню мРНК, кодирующей белок дисульфид изомеразу (PDI), участвующий в фолдинге белков (цит. по Penttilä, 1998).

Другие примеры гетерологичных белков, продуцируемых *T. reesei*. Кроме химозина и Fab-фрагментов, с помощью грибов *Trichoderma* получают также интерлейкин-6. Предварительные эксперименты показали, что уровень секреции составил 5 мг/л. В этой работе сайт расщепления для фермента Kex2 был введен в линкерную последовательность СВНІ. Kex2 является протеазой комплекса Гольджи. Показано, что у *S. cerevisiae* и *Aspergillus* протеаза Kex2 *in vivo* расщепляет сшитые белки, которые имеют специфические сайты распознавания протеазами (чаще всего Lys-Arg). Этот тип последовательности обнаруживают в незрелых белках плесневых грибов, таких, как ХУНІІ и СВНІ *T. reesei*. Правильно расщепленный интерлейкин-6 секретировался *T. reesei*, что свидетельствовало о том, что данный штамм обладал активностью, подобной Kex2. Установлено также расщепление сшитого с глюкоамилазой *Aspergillus* интерлейкина-6 по сайту распознавания протеазой Kex2 с N-конца интерлейкина-6. Эти результаты показали, что протеолитическое расщепление этого типа может быть использовано для продукции белков *Trichoderma*, которое может быть выгодно, поскольку расщепление коммерческими протеазами *in vitro* не эффективно и дорого. Было предпринято клонирование гена Kex2 для получения суперпродукции и эффективного расщепления сшитых белков. Однако опыты по клонированию привели к появлению праймеров, основанных на гомологичных сиквенсах, к тому же попытки получить мутанты дрожжей по Kex2 были безуспешными, хотя некоторые клоны с субтилизин-подобной протеазой были получены (цит. по Penttilä, 1998).

Fab-фрагменты не содержат сайтов N-гликозилирования. Большая часть нативного химозина также не гликозилирована, продукт *T. reesei* также не имеет сайтов гликозилирования. По данным электрофореза, цистеиновая эндопептидаза В ячменя, секретируемая штаммом RutC-30 *T. reesei*, в отличие от нативного фермента, гликозилирована. Глюкоамилаза *Hormonicus resiniae*, секретируемая штаммом ALKO 2221 *T. reesei*, гликозилирована иначе, чем фермент хозяина, поскольку на электрофореграмме геля видно, что трансгенный фермент мигрирует более дисперсно, чем нативный фермент. Судя по действию эндогликозидазы Н, трансгенный фермент содержит сайты N-гликозилирования. По-видимому, уровень гликозилирования трансгенного фермента не превышал естественный уровень, поскольку молекулярный вес полученного белка не очень отличался от веса белка *Hormonicus resiniae*. Поскольку сайты гликозилирования белков могут зависеть от штамма и состава среды, трудно судить о реальных различиях гликозилирования между видами только на основании электрофореза и нескольких образцов (цит. по Penttilä, 1998).

При изучении экспрессии цистеиновой эндопептидазы В (ЕРВ) ячменя исследована локализация белка в различных частях гифов грибов, культивируемых на агаре. мРНК, кодирующая ЕРВ, и белок были локализованы в молодых апикальных и субапикальных участках гифов, тогда как СВНІ была локализована в старых участках мицелия. В кончиках гифов не наблюдали мРНК ЕРВ и СВНІ, что свидетельствовало о том, что после синтеза белки транспортируются в кончики гифов для секреции. Было бы интересно узнать, показывают ли разные результаты о синтезе и секреции действительные различия между трансгенным и нативным белком. С другой стороны, в результате аналогичного анализа было показано, что химозин и СВНІ локализованы вдоль гифов, как и химозин, сшитый с СВНІ, хотя ранее было показано, что химозин локализован более всего в клеточной стенке (цит. по Penttilä, 1998).

Как показано в таблице 4.4, высокий уровень секреции гетерологичных белков грибного происхождения был получен в случае использования промотора *cbh1*, но не было попыток получать белки, сшитые с СВНІ. Применение стратегии сшивания с

СВНІ привело к тому, что уровень продукции глюкоамилазы у *Hormonicus resiniae* возрос в 20 раз, вырос уровень продукции эндохитиназы *T. harzianum* или даже в 1000 раз в случае фитазы *A. niger*. Продуктивность фитазы сравнима с продуктивностью рекомбинатного штамма *A. niger*, содержащего несколько копий гена фитазы и промотор глюкоамилазы, но препарат на основе ферментов *T. reesei* применялся в кормопроизводстве, поскольку препарат содержал высокую активность β -глюканазы и низкую активность глюкоамилазы.

Эндохитиназа *T. harzianum* секретируется штаммом *Trichoderma reesei* в количестве нескольких граммов на литр в биореакторе. Результаты приобрели большое значение, когда стало известно, что эндохитиназа *T. harzianum* гораздо токсичнее для штаммов *Trichoderma*, чем для хозяина гена и других грибов. Кроме своей токсичности, фермент также влиял на трансгенного продуцента. Кислая внеклеточная протеаза деградирует эндохитиназу на поздних стадиях культивирования, хотя существует возможность синтеза большого количества белка, судя по значительному содержанию мРНК и продолжающейся секреции СВНІ. По сравнению с СВНІ, отношение секретируемого белка эндохитиназы к уровню мРНК значительно ниже, что свидетельствует о нарушениях процессинга трансгенного белка после транскрипции. Результаты, полученные в опытах, свидетельствовали о том, что транскрипция промотора *cbh1* эндогенного гена *cbh1* или трансгена обеспечивает максимальный уровень экспрессии, но факторы транскрипции могут лимитировать увеличение экспрессии, уровень которой коррелирует с числом копий трансгена. Похоже, что три копии промотора *cbh1* обеспечивают максимальный уровень экспрессии, о чем свидетельствовали данные опытов, проведенных с целью повышения экспрессии эндогенных генов *T. reesei*. Поскольку регуляция экспрессии многих генов хитиназ координирована, делеция одного гена приводит к повышению экспрессии остальных хитиназных генов. Следовало бы проверить, можно ли увеличить экспрессию трансгенов у штаммов, в геноме которых наблюдается делеция в области генов целлюлаз. Кроме вышеперечисленных примеров, Cayla Ltd. получены штаммы *Trichoderma reesei* с высоким уровнем секреции лизоцима человека, сшитого с СВНІ, или глюкоамилазой *A. niger* или бактериальным белком устойчивости к флеомицину (цит. по Penttilä, 1998).

4.6. Производство и применение биофунгицидов на основе *Trichoderma*

Идея биологического метода борьбы с вредителями растений была выдвинута еще в конце прошлого века, но не получила интенсивного развития отчасти потому, что в те времена более перспективным казался химический метод. Интерес к биологическому методу резко возрос в связи с достижениями в области биотехнологии.

Коммерческий потенциал подобных продуктов зависит от их эффективности, соотношения затрат и прибыли в сравнении с синтетическими химикатами, простотой использования и спектром действий.

Приоритетное положение в защите растений от фитопатогенов занимают грибы рода *Trichoderma* – *T. harzianum* Rif, *T. viride* (Pers.) Fr и др. Все биопрепараты на основе этих грибов в России до 2003 года называли триходермином, препаративные формы которых различаются в зависимости от исходного штамма, состава питательной среды, способа культивирования, титра готового препарата. Изучение свойств грибов *Trichoderma* в течение 55 лет показало, что биоконтрольные штаммы безопасны для животных и человека. Первый отечественный грибной препарат против болезней растений разработан в ВИЗР на основе *T. Viride* (Pers.) Fr (старое название *T. lignorum*) (Штерниш и др., 2004). Препарат триходермин получают на основе культивирования гриба на различных природных субстратах: отходах, продуктах

пищевой или перерабатывающей промышленности (гидролизаты древесины, меласса, барда, соломенная резка, пшеничные отруби). Данные субстраты обогащают минеральными солями (Громовых, 2002).

4.6.1. Требования к разработке успешных биоконтрольных систем

Биоконтрольные системы должны состоять из трех главных компонентов: 1) наиболее активный биоконтрольный штамм, 2) система производства, дающая соответствующие материалы, 3) система воспроизводства жизнеспособных пропагул, которые позволяют грибу выжить и размножиться.

Наиболее активный биоконтрольный штамм

Каждая система должна начинаться с получения высокоэффективного штамма. В большинстве случаев такие штаммы выделяют из природной среды, в некоторых случаях их получают путем мутагенеза или селекции в сторону увеличения устойчивости к фунгицидам (O'Neill et al., 1996; Das et al., 2003). К примеру, генетически модифицированный штамм *Trichoderma virens* стабильно сохранял трансген, экспрессировал устойчивость к гигромицину и обладал способностью деградировать фосфорорганические антибиотики (Weaver et al., 2003).

Высокоэффективный штамм можно получить путем слияния протопластов штаммов, полученных путем интенсивной селекции. Полученный химерный штамм мог расти быстрее и колонизировать ризосферу. Трансгенные коммерческие штаммы, к сожалению, находятся в стадии изучения. Для получения эффективных штаммов следует использовать все методы.

Несмотря на наличие эффективного штамма, использовать его нельзя до тех пор, пока не будут разработаны методология воспроизводства штамма и соответствующие системы. По мнению Хармана и Бьеркмана (Harman, Björkman, 1998), идентификация эффективного штамма – это самая ранняя стадия разработки биоконтрольной системы. После идентификации штамма может пройти несколько лет, прежде чем будут идентифицированы, испытаны и преобразованы для коммерческого использования биоконтрольные продукты. Но если инвесторы и производители имеют опыт, то даже получение одного штамма может привести к успеху. Таким образом, в будущем отрезок времени от получения эффективного штамма до коммерческого использования значительно уменьшится.

Методология производства

Биоконтрольные микроорганизмы могут производиться в больших количествах. Метод воспроизводства должен предоставлять материал со следующими характеристиками:

- 1) препарат должен быть эквивалентен или лучше, чем химические пестициды;
- 2) препарат должен содержать высокий уровень основного штамма, сопутствующие микроорганизмы должны быть сведены до минимума или отсутствовать;
- 3) продукт должен быть безопасным, обладать незначительной токсичностью в отношении млекопитающих и не оказывать влияния на другие виды;
- 4) препарат должен сохранять свои свойства не менее года без замораживания, его качества не должны меняться в зависимости от упаковки;
- 5) название и описание препарата должно облегчать применение в существующем сельском хозяйстве и в других целях;
- 6) низкие затраты на крупномасштабное производство.

Биомассу, отвечающую таким требованиям, можно производить в жидкой или агаризованной средах, но физиология и тип пропагул (гифы, конидии или хламидоспоры) должны быть изучены, а пропагулы должны быть оптимизированы для использования.

Системы внесения препарата

Метод применения эффективного штамма может быть решающим для успеха. Для коммерческого использования препарата должна быть установлена экономически эффективная доза, могут потребоваться адъюванты, фунгициды в комбинации с препаратом. Могут потребоваться дозаторы и аппараты. Потребуется довести рН до оптимального значения. Часто способы внесения препарата отличаются у разных культур из-за биологических и экономических факторов. В конце главы будут рассмотрены успешные коммерческие препараты и методы их применения.

Вся информация о препарате и культурах, на которых препарат может быть использован, должна содержаться в описании препарата. В описании должны быть приведены наиболее успешные данные о подавлении одного или нескольких фитопатогенов и примеры повышения урожайности нескольких культур. В описании должны быть четко сформулированные и понятные инструкции для пользователей.

Юридические и экономические заключения

Для успешного применения биоконтрольных систем необходимы некоторые компоненты. Важно, чтобы биоконтрольный штамм и/или процессы, были защищены патентами или соответствующими документами. Во-первых, успешные продукты могут быть без труда повторены (копированы). Во-вторых, штаммы должны пройти токсикологическое тестирование, принятое согласно федеральному законодательству, перед продажей и использованием. В-третьих, необходимо провести маркетинговое исследование в данной географической зоне. Все эти этапы требуют инвестиций объемом несколько млн. долларов, поэтому необходимо участие корпораций. Поскольку многие биоконтрольные штаммы и системы были разработаны в государственных общедоступных институтах, следует перевести разработки в закрытые частные компании. Во многих случаях частная компания доводит продукт до практического применения.

Требования к биопестицидам, принятые в Российской Федерации от 28.07.2002 г.

Характеристика биопестицида

A1. Общие сведения.

Заявитель (название, адрес, телефон, факс).

1. Производитель продукта и действующего вещества.
2. Разрешение заявителю представлять производителя.
3. Отличительное название (торговое).
4. Назначение.
5. Действующее начало (микроорганизм) или вещество (по ISO, IUPAK, N CAS).
6. Химический класс (для продуктов микробного синтеза).
7. Концентрация (в г/л или г/кг).
8. Препаративная форма.
9. Регистрация в других странах (номер регистрационного удостоверения, дата выдачи, сфера и регламент применения).

C 4. Микробиологические препараты.

C4-1. Свойства штамма-продуцента.

1. Видовое название микроорганизма (латинское название).
2. Номер и название штамма (изолята).
3. Источник выделения штамма.
4. Культурально-морфологические, биохимические свойства, тесты и критерии идентификации (указать также учреждение, проводшее идентификацию).
5. Механизм действия на целевой объект.
6. Способ, условия и состав сред для хранения штамма.
7. Способ, условия и состав сред для размножения микроорганизмов. Для и микроспоридий указывается характеристика специфического сырья для выращивания.

8. Способ обнаружения микроорганизмов в микробных ассоциациях окружающей среды и биоматериале.
9. Продукт, синтезируемый штаммом (химический состав, структурная формула, стабильность, метод определения остатков).

С4-2. Характеристика препаративной формы.

Состав препарата: содержание действующего начала (титр живых клеток или продукта их жизнедеятельности, титр вирусных тел, включений), вспомогательных веществ и их назначение.

1. Агрегатное состояние.
2. Смачиваемость.
3. Содержание влаги.
4. Содержание посторонней микрофлоры.
5. Метод определения действующего начала.
6. Условия и сроки хранения.
7. Способ приготовления рабочих растворов.
8. Совместимость с другими пестицидами.

Д. Токсиколого-гигиеническая характеристика.

Д4. Токсикологическая оценка микроорганизма.

1. Патогенность (вирулентность, токсичность, токсигенность, диссеминация) для млекопитающих.
2. Действие микроорганизмов на иммунную систему при поступлении через дыхательные пути в течение одного месяца.

Д5. Токсикологическая оценка продуктов микробного синтеза.

Острая пероральная токсичность (мыши, крысы) – ЛД₅₀.

1. Острая кожная токсичность – ЛД₅₀.
2. Острая ингаляционная токсичность – ЛД₅₀.
3. Раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки.
4. Подострая пероральная токсичность (кумулятивные свойства), коэффициент кумуляции (для препаратов, производящихся в России).
5. Подострая накожная токсичность.
6. Подострая ингаляционная токсичность.
7. Сенсibiliзирующее действие, иммунотоксичность.
8. Хроническая токсичность.
9. Онкогенность.
10. Тератогенность и эмбриотоксичность.
11. Репродуктивная токсичность по методу двух поколений.
12. Мутагенность:

- тест Эймса на генные мутации с микросомальной активацией и без активации;
- хромосомные aberrации (in vivo у лабораторных животных);
- in vitro в культуре лимфоцитов периферической крови человека.

Допускаются другие стандартные тесты, но не менее трех, включая тест Эймса.

Метаболизм в организме млекопитающих, основные метаболиты, их токсичность, токсикокинетика и при необходимости токсикодинамика.

1. Лимитирующий показатель токсичности.
2. Допустимая суточная доза (ДСД) мг/кг/вес тела человека.
3. Стойкость и метаболизм в объектах окружающей среды и в сельскохозяйственных растениях.

Гигиенические нормативы в продуктах питания и объектах окружающей среды (или научное обоснование нецелесообразности нормирования), обеспечивающие безопасность населения и работающих при производстве и применении пестицидов:

1. Максимально допустимый уровень (МДУ/ВМДУ) в продуктах питания и сельскохозяйственном сырье.

2. Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воде санитарно-бытового водопользования ОБУВ/ПДК в воздухе рабочей зоны (для препаратов, производящихся на территории России).
 3. ОБУВ/ПДК в атмосферном воздухе (для препаратов, производящихся на территории России).
 4. ОБУВ в воздухе рабочей зоны (для зарубежных препаратов).
 5. ПДК для почвы (для стойких препаратов, способных к транслокации в растения и миграции в сопредельные среды).
 6. ОДК в почве для остальных препаратов.
 7. Методические указания по определению остаточных количеств пестицида в продуктах питания, биологических средах и объектах окружающей среды.
 8. Оценка опасности пестицида – данные рассмотрения на заседании группы экспертов ФАО/ВОЗ, ЕРА, Евросоюза.
- Д6. Токсикологическая оценка препаративной формы микробиологического препарата
1. Острая пероральная токсичность (мыши, крысы) – LD₅₀.
 2. Острая ингаляционная токсичность – LD₅₀.
 3. Раздражающее и резорбтивное действие на кожу и слизистую оболочку.
 4. Сенсибилизирующее и иммунотоксическое действие.
 5. Кумулятивные свойства (для препаратов на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов).
 6. Дисбактериотическое действие.
 7. Состав контаминантной микрофлоры (для вирусных и микроспоридиальных препаратов).
 8. Токсикологическая характеристика компонентов препаративной формы.
- Д7. Гигиеническая оценка производства и применения микробиологических препаратов
- Д7-1. Гигиеническая оценка реальной опасности (риска) воздействия на население микробиологических препаратов:
1. Оценка опасности для населения пищевых продуктов, полученных при применении пестицида. Изучение остаточных количеств пестицида в случае необходимости гигиенического нормирования (см. ДЗ.1).
 2. Оценка опасности пестицида при поступлении с водой или обоснование нецелесообразности проведения этих исследований.
 3. Оценка опасности пестицида при загрязнении атмосферного воздуха или обосновании нецелесообразности проведения этих исследований.
 4. Оценка потенциальной опасности (расчетные данные) комплексного воздействия пестицида на население при поступлении его с пищей, воздухом и водой, или обоснование нецелесообразности проведения этих исследований.
- Д7-2. Гигиеническая оценка условий труда при применении препарата:
1. Гигиеническая оценка условий труда при применении препарата с учетом максимальных норм расхода и различных технологий проводится в соответствии с ДЗ-2 (при необходимости).
- Д7-3. Гигиеническая оценка производства:
- Гигиеническая оценка производства проводится в соответствии с ДЗ-3.

Требования к биопестицидам, принятые в Европе (Канада)
(на примере биофунгицида *Trichoderma harzianum* KRL-AG2)

Использование биофунгицида *Trichoderma harzianum* KRL-AG2

Препарат вносят в ростовую среду под томаты, огурцы, декоративные растения и прямо в горшки. Препарат в виде пудры разбавляется водой и распыляется на поверхность посадочного материала. Плотность нанесения препарата 115-220 г продукта на м³ среды/почвы. Клубни декоративных растений перед посадкой замачивают в суспензии 120 г препарата/л. Гранулярный препарат запаховывается в почву или перемешивается с почвой до содержания 600 г препарата на куб. м. субстрата.

Trichoderma harzianum KRL-AG2 получен в результате слияния двух ауксотрофных штаммов, полученных путем облучения УФ и селекцией на устойчивость к беномилу. Оба они были выделены из почвы Колумбии.

Методы анализа микроорганизмов как промышленного продукта

Методы идентификации микроорганизмов

Использовались 2 метода: изозимный анализ для разделения промышленного штамма от других и метод морфологического разделения признаков колоний (рост гиф, половые и бесполовые фазы, конидиофоры и хламидоспоры, проверялось воздействие питательных веществ, света и pH на споруляцию).

Идентификация видов была выполнена по стандартной микологической методике, принятой для этого рода.

Анализ изозимов проводился с помощью электрофореза. Для разделения использовался картофельный агар, содержащий циклогексинид, хлортетрациклин, нистатин, стрептомицин сульфат и игепал.

Анализ вторичных метаболитов не проводился.

Методы установления чистоты

Материнская и стартовая культура сохранялись на силикогеле при -20°C . Проводился анализ стартовой культуры на генетическую стабильность. Бактериальные загрязнения проверялись посевом на соевый триптический агар, а грибные – на картофельный агар. Все колонии очищались и проводился фингерпринт-анализ при необходимости определения более 7×10^7 КОЕ/г. Однако в конечном продукте не должно быть ничего.

Методы определения содержания микроорганизмов в конечном продукте. В зависимости от методики на каждом этапе отбирается от 3 до 5 проб и проверяется жизнеспособность штамма (КОЕ-тест).

Методы определения допустимых примесей в промышленном продукте. Проводится мониторинг токсических продуктов – проверяют все газы, белки. Необходима обработка ростовой среды, чтобы не было патогенов и условных патогенов в препарате. В конечном гранулярном продукте содержится бактерий до 10^5 КОЕ/г, а в пудре $3,5 \times 10^6$ КОЕ/г. Грибное заражение допускается менее 10^5 КОЕ/г.

Методы, показывающие отсутствие патогенов человека и животных. Они должны применяться на всех этапах приготовления препарата.

Методы определения сохранности препарата и времени жизни микроорганизмов Конечные препараты хранятся в темноте при $0-6^{\circ}\text{C}$, каждые 3 месяца ставится КОЕ-тест. При хранении препарата в течение 12 месяцев следует проводить 14-19 анализов.

Методы определения примесей живых или неживых активных микроорганизмов и их метаболитов. Следует проверять остаточные метаболиты промышленного штамма в пищевых продуктах и в кормах. Тест на содержание пептаиболов, трихорзиаминов, трихокендинов, трихорзинов и харзионинов.

Необходимая характеристика препарата:

1.0. Воздействие на здоровье человека и животных.

1.1. Интегративная токсичность и инфекционность.

Все эти исследования нужны для регистрации препарата. В опытах на животных проверяется воздействие на органы и ткани. Используют все принятые тесты на онкогенность, мутагенность и тератогенность. Эти исследования должны проводиться постоянно.

1.2. Случаи гиперчувствительности.

Препарат проверяется на чувствительность на коже животных, если она выявлена, продукт маркируется вот так: Potential Sensitive.

1.3. Воздействие на здоровье человека и животных в результате воздействия активного вещества.

1.3.1. Оценка риска длительного воздействия.

Опыты по воздействию на покровы, глаза.

Все токсикологические тесты, принятые без химических пестицидов.

2.0. Остаточность.

Требуется тест – влияние вторичных метаболитов при применении под томаты и огурцы.

Максимальные границы остаточности.

Все полученные антибиотики и токсины должны быть указаны и ПДК для них в соответствующем акте. В паспорте должны быть указаны все методы анализов и экстракции.

3.0. Судьба и поведение в природе.

Проводятся полевые исследования, отбирается почва, корневой дермис и помещаются на микроучастки и не трогаются всю зиму, весной берутся пробы на КОЕ-тест промышленного штамма и других *Trichoderma*. Весной на эти микроучастки высеваются необработанные семена кукурузы и сои, потом анализируется колонизация корней этих растений.

4.6.2. Производство препаратов на основе *Trichoderma*

Биопрепараты нарабатываются, как правило, специализированными фирмами или региональными биологическими лабораториями в основном по заявкам производителей сельскохозяйственной продукции (Штерниш и др., 2004).

Грибные препараты, применяемые в защите растений от болезней, можно разделить на две группы:

препараты на основе живых культур микроорганизмов-антагонистов и гиперпаразитов,

препараты на основе антибиотиков, продуцируемых грибами. Производство антибиотиков возможно только на специализированных предприятиях биологической промышленности с довольно сложным технологическим оборудованием. Биопрепараты на основе живых культур доступны для приготовления в биологических лабораториях или фирмах.

Сейкетов Г.Ш. (Сейкетов, 1982) для получения больших количеств препарата триходермина создал специальный аппарат – перкалятор (ферментер). В нем происходят последовательно два процесса: стерилизация питательного субстрата (виноградная выжимка) и рост гриба (рис. 4.7).

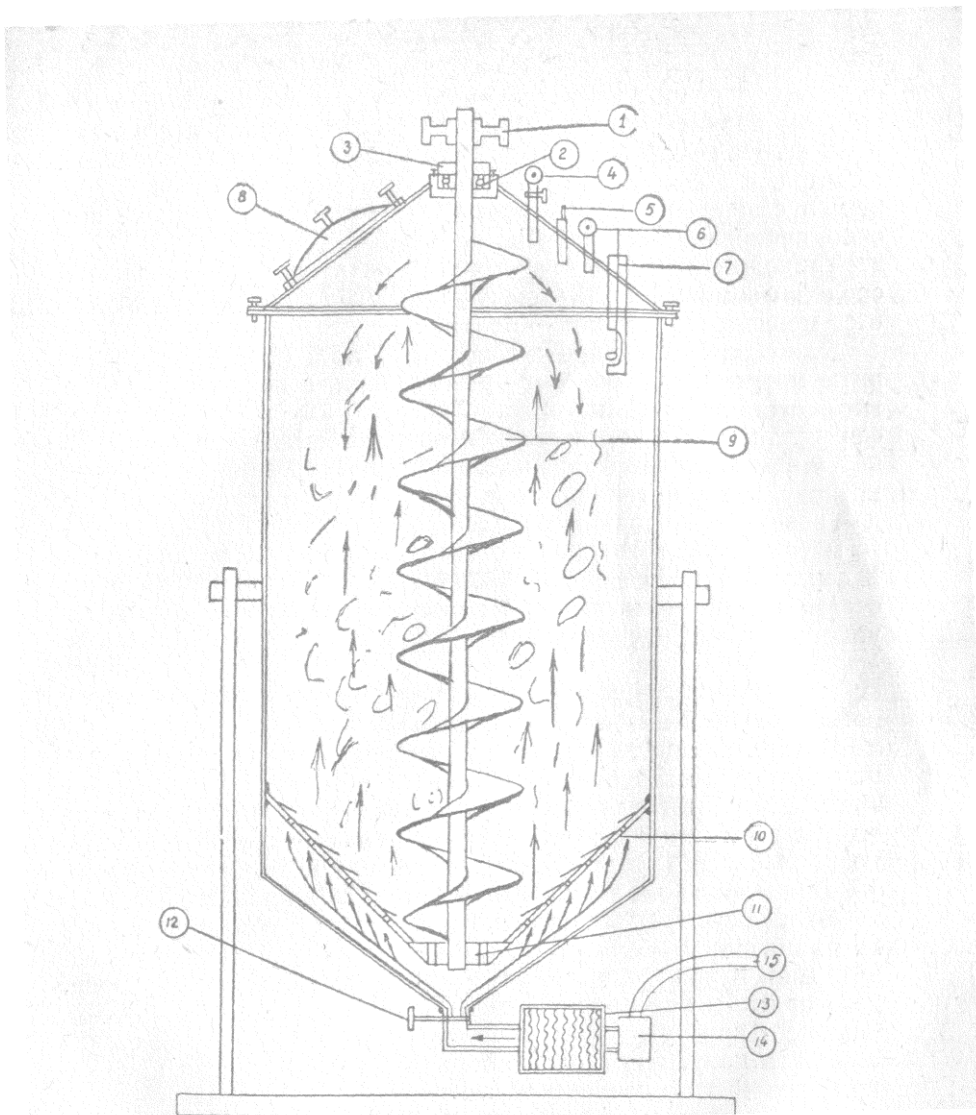


Рис. 4.7. Схема перкалятора (рис. адаптирован из Сейкетов, 1982).

Громовых с соавторами (2003) разработана промышленная установка, позволяющая получать комбинированный препарат на основе живых культур и их метаболитов.

Коломбет разработана пастообразная форма препарата на основе живых культур (2005).

Производство конидий путем ферментации на твердых средах

Процесс ферментации на твердой среде (ФТС) можно представить как четырехфазную систему. Первая фаза является воздушной средой, при постоянной аэрации твердой среды. Вторая твердая фаза представляет собой нерастворимую в воде среду, содержащую третью фазу, водный раствор питательных элементов. Раствор тесно связан с нерастворимым матриксом. Однако некоторое количество воды может находиться в свободном состоянии в виде капиллярной влаги, хотя эта вода не влияет на влагоемкость матрикса. Четвертой фазой является сам микроорганизм, который растет на поверхности и / или в доступной зоне матрикса (Agosin, Aguilera, 1998).

Известно, что ФТС обладает некоторыми преимуществами в производстве, такими, как высокая продуктивность, методическая простота, сниженные энергетические затраты, низкое количество отходов и высокое качество продукта. В отличие от глубинного культивирования в жидкой среде, ФТС приближена к природным условиям, в которых виды *Trichoderma* spp. длительно адаптированы к

твердому субстрату (Гринько, 2004). Споруляция грибов происходит в естественных условиях на воздушном мицелии. Конидиогенезу при ФТС присущи следующие характерные черты:

Конидии, полученные на воздушном мицелии, сохраняются лучше при неблагоприятных условиях среды, чем конидии, полученные при жидком культивировании. Например, жизнеспособность воздушных спор полностью сохранялась после 60 дней при хранении при 75% влажности, тогда как жизнеспособность спор, полученных при жидком культивировании, снижалась более чем на 15% за тот же период.

Клеточные стенки воздушных конидий в два раза толще, чем стенки спор, полученных при выращивании в жидкой среде. Клеточная стенка является первым барьером, противостоящим внешним воздействиям, поэтому, возможно, что ее характеристики влияют на жизнеспособность и сохранность спор, на способность биоконтрольного агента развиваться успешно.

Только воздушные споры обладают гидрофобными свойствами. Гидрофобность считается ключевым параметром для адгезии и развития микроорганизма в филлоплане. Таким образом, гидрофобность позволяет воздушным спорам быстро и эффективно адсорбироваться на поверхности листа и других частях растений. По данным анализа гидрофобность обеспечивается присутствием низкомолекулярных веществ, таких, как трихозианины и присутствием белков типа гидрофобин. Белки типа гидрофобин отсутствуют в клеточных стенках спор, полученных при жидком культивировании, поскольку эти вещества вымываются в культуральную среду (Agosin, Aguilera, 1998).

Оптимизация условий культивирования на модельном уровне

Лабораторные «биореакторы». Большинство экспериментов ФТС было проведено в конических колбах, содержащих тонкий (не более 5 см) слой среды, где аэрация осуществлялась естественным образом. Контролировать такие условия можно только в ограниченном масштабе. Разработана более удобная экспериментальная система для оптимизации условий культивирования в полупромышленном масштабе. Установки представляли собой небольшие, плоские биореакторы со средой, нанесенной на перфорированную пластинку, через отверстия которой происходила принудительная аэрация. К реактору подводились тонкие цилиндрические колонки, через которые можно было регулировать влажность среды, температуру и степень аэрации, и, таким образом, регулировать условия среды (Agosin, Aguilera, 1998).

Разработаны динамические лабораторные системы, такие, как вращающиеся цилиндрические реакторы и встряхивающиеся сосуды. Эти системы оснащены контролирующим и измерительным оборудованием, благодаря чему ферментацию можно проводить в контролируемых условиях с учетом температуры, газового состава и влажности.

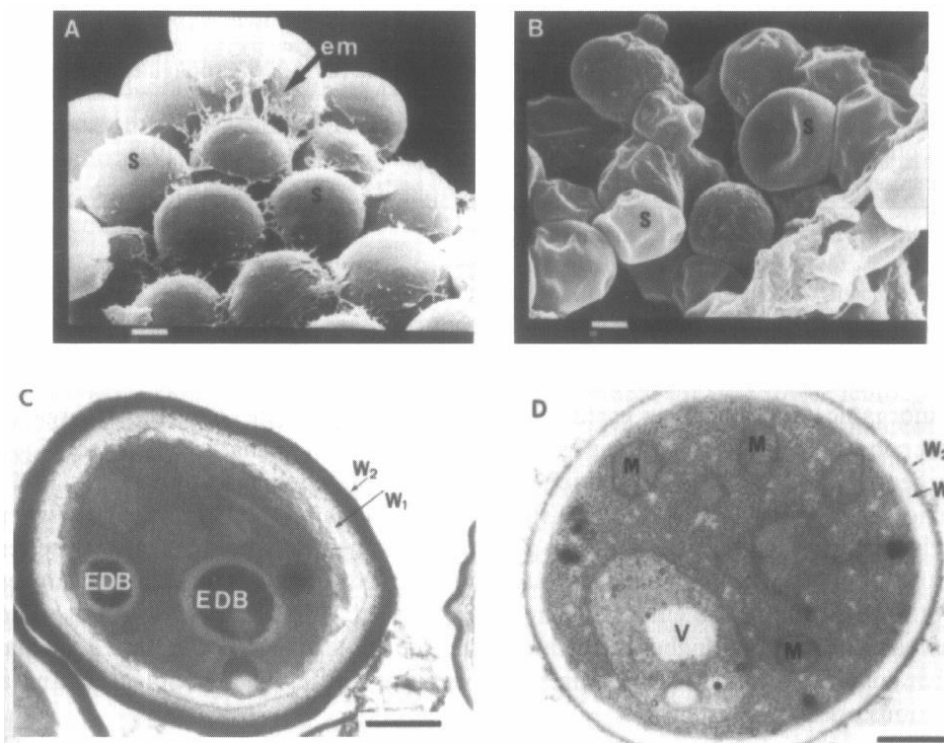


Фото 4.8. Сканирующие электронные микрофотографии (А, В) и трансмиссионные электронные микрофотографии (С, D) воздушных (А, С) и полученных в жидкой среде (В, D) конидий *Trichoderma harzianum*. Символы: em – слизь, W1 – внутренний слой клеточной стенки; W2 – внешний слой клеточной стенки; V – везикулы; М – митохондрии; EDB –плотные тельца. Размер черных полос 0,5 мкм (фото адаптировано из Agosin, Aguilera, 1998).

Оптимизация среды. Кинетические параметры ФТС описаны во многих работах и выражены с помощью разнообразных формул. Поэтому делать заключения и сравнивать параметры следует с осторожностью. В большинстве работ, посвященных оптимизации, приводятся значения продуктивности, выраженные как число спор на кг сухого веса в час. Эти единицы будут использоваться в дальнейшем (табл. 4.5). Однако, показатель объемной продуктивности более удобен при сравнении обеих систем ферментации (Agosin, Aguilera, 1998).

Т а б л и ц а 4.5

Производство спор видов *Trichoderma* путем ферментации на твердых средах (цит. по Agosin, Aguilera, 1998).

Источник	Число спор на кг	Время (ч)	Число спор на кг в час
Roussos et al. (1991)	5×10^{13}	144	$3,5 \times 10^{11}$
Kubota (1995)	1×10^{13}	168	$6,0 \times 10^{10}$
Agosin et al. (1997)	1×10^{13}	72	$1,4 \times 10^{11}$

Традиционно в ФТС используются сельскохозяйственные продукты: пшеница, рис, кукуруза и соответствующие продукты из них (Гринько, 2004). Эти органические материалы играют двойную роль – источника питания и твердого матрикса, необходимого для адгезии микроорганизма. Матрикс представляет собой неорганический (диатомовая земля, минеральные гранулы, вермикулит) или органический материал (кукурузные стержни, пульпа кормовой свеклы, отжимки сахарной свеклы, зола и т.д.). Подобные среды были разработаны для получения ряда метаболитов. Такой подход обеспечивал большую чистоту продукта, постоянство субстратной константы в течение культивирования, лучший контроль микробного метаболизма и высокую степень сорбции культуральной среды. Однако у этого метода

есть недостатки, среди которых высокая стоимость субстратов, необходимость более концентрированной среды (что может привести к катаболитной репрессии), а также низкий водный потенциал и энергозатратная операционная система.

Грибные споры для биоконтроля успешно производятся на средах с инертным твердым матриксом (ИТМ). Ранние опыты по выращиванию грибов на таких средах в основном проводились с использованием диатомовой земли, на которую наносили 10% раствор мелассы для выращивания конидиальной биомассы *Trichoderma harzianum*. К сожалению, в работах нет сведений о продуктивности. Самая высокая продуктивность спор была достигнута на жоме сахарной свеклы, пропитанной раствором крахмала с добавлением перьевого материала. Полученные таким образом споры сохранялись в течение длительного периода времени (Agosin, Aguilera, 1998).

В заключение можно сказать, что высококачественные споры в большом количестве успешно производятся путем ФТС в полупромышленном масштабе. Главным преимуществом таких спор является их способность к длительному сохранению жизнеспособности. Возможно, что сохранение жизнеспособности в неблагоприятных условиях среды обеспечивается физиологическим состоянием спор, образованных на воздушном мицелии. В этом отношении гидрофобность фиалоконидий *Trichoderma harzianum* вносит свой вклад в сохранение устойчивости воздушных спор. Напротив, споры, полученные путем жидкого культивирования, быстро реагируют на внешнюю среду. Увеличение воды или питательных веществ может привести к сокращению времени прорастания по сравнению с воздушными спорами. Однако они более чувствительны к засухе и нуждаются в последующей обработке (Agosin, Aguilera, 1998).

Самым важным ограничением процесса ФТС является мониторинг и контроль процесса. Многофазная система при ФТС не позволяет проводить мониторинг on-line, что легко осуществляется при жидкостном культивировании. Тем не менее, можно постоянно следить за такими параметрами, как температура среды и воздуха, рН, скорость потребления кислорода и образования углекислого газа, так же, как и давление. Последние три параметра особенно интенсивно использовались для оценки роста биомассы (Agosin, Aguilera, 1998).

Критические условия мониторинга

Самой критической проблемой в процессе ФТС является трудность отвода тепла, поскольку термическая проводимость среды низка. Среди испытанных способов постоянного отвода тепла наиболее удачным является охлаждение воздушной фазы путем введения охлажденного воздуха. Однако потоки воздуха приводят к изменению водного профиля, что отражается на росте биомассы и образовании продукта. Необходимо периодическое введение свежей стерильной воды (Agosin, Aguilera, 1998).

Таким образом, неудивительно, что поддержание постоянной температуры и баланса воды в настоящее время считаются наиболее вероятными критериями оценки систем ФТС и даже считаются ключевыми для коммерциализации процессов на основе ФТС. Более того, гетерогенность и особенности распределения в системе вызывают необходимость периодического увлажнения твердого матрикса. Это очень важно для постоянства параметров, таких, как температура в газовой и водной фазах и при переходах из газа в жидкость и из жидкости в газ. Однако перемешивание твердой среды может оказывать отрицательное воздействие на поровую структуру субстрата, может нарушать взаимодействие микроорганизмов с матриксом и может повреждать грибной мицелий при увеличении абразивности частичек матрикса. Возникающее напряжение может приводить к нарушению структуры поверхности субстрата и разрушению гиф, выросших между частицами субстрата. Такое разрушение гиф оказывает положительный эффект, поскольку предотвращает рост грибного мицелия сплошной единой массой. И напротив, если на поверхности субстрата разрушается

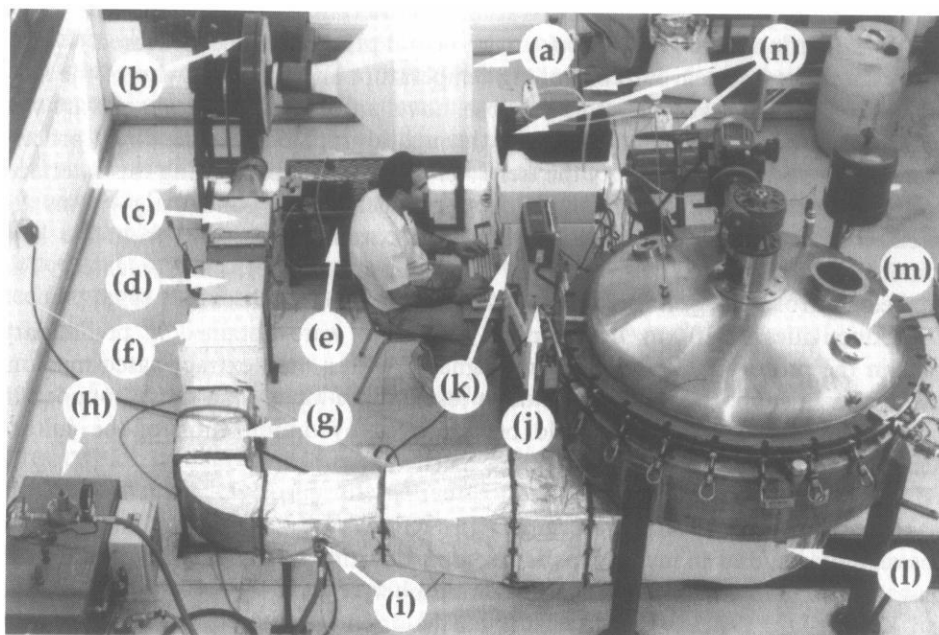
воздушный мицелий, то споруляция может быть подавлена. Таким образом, для получения спор для инокулята следует сохранять статичность культур. Однако системы увлажнения в реакторах ФТС можно разработать так, чтобы снизить вероятность вредных последствий перемешивания. Во всяком случае, перемешивание должно осуществляться только при необходимости, а увлажнение должно быть постоянно. Очевидно, что следует изучать влияние перемешивания на ФТС, чтобы оптимизировать системы перемешивания (Agosin, Aguilera, 1998).

Типы ФТС реакторов для производства конидиальной биомассы. В отличие от реакторов для жидкостного культивирования, которые имеют похожий дизайн, для ФТС разработаны реакторы различных типов. Изменение конфигурации биореактора может значительно улучшить показатели продуктивности. Некоторые реакторы созданы для промышленного производства конидий *Trichoderma* путем ФТС, и большинство систем защищены патентами (Agosin, Aguilera, 1998).

Лоточные биореакторы. Лоточные биореакторы успешно применялись в лабораториях, в пилотных опытах и для коммерческого производства. В этой системе среда наливается тонким слоем в низкий противень или на алюминиевый или стальной поддон. В данной системе отсутствует принудительная аэрация, хотя дно поддона может быть перфорированным. Температура и влажность может регулироваться, или же поддоны помещаются в комнаты с нужной температурой и влажностью. В качестве альтернативы используются полиэтиленовые коробки с перфорированным дном вместо поддонов. Самым главным недостатком реакторов этого типа является то, что систему трудно автоматизировать, поэтому используется слишком много ручного труда. Также трудно сохранять стерильность процесса, и требуются большие площади (Agosin, Aguilera, 1998).

Секционные биореакторы. Высокая продуктивность в производстве конидий также была достигнута в реакторе Zymotis, новом 50 кг биореакторе с разделенным дном. Вся масса для ферментации распределяется по нескольким секциям, разделенным пространствами для отвода тепла. Ячейки могут управляться по-разному: путем добавления или изымания отдельных секций. Интересно, что активная площадь в реакторе Zymotis меньше, чем в лоточных биореакторах, что свидетельствует о том, что высокие урожаи можно получить при выращивании биомассы не только на поверхности среды, но и при ферментации всего субстрата (Agosin, Aguilera, 1998).

Барботажные биореакторы. Несмотря на публикации о том, что увлажнение приводит к подавлению споруляции, разработан окупаемый промышленный процесс на основе увлажняющего биореактора для производства грибного биопестицида на основе *Beauveria bassiana*. Фирма Calliope Inc. во Франции продает этот продукт в гранулированном виде. Процесс осуществлялся в реакторе, прототипом которого являлся реактор фирмы INRA-Dijon. Этот реактор объемом в 1 т был разработан с использованием оборудования для нагревания ячменя. Субстрат толщиной в 1 м в биореакторе наносили на ячеистую проволочную сетку. Воздух постоянно продувался через массу субстрата. Увлажнение обеспечивали три вертикальных гребных винта на крышке реактора, через которые можно было подавать воду прямо в субстратную массу. Винты вращались со скоростью 22 об/мин, лопасти винтов поднимались и опускались во всем объеме реактора. Температуру среды на дне реактора контролировали автоматически. Содержание воды оценивали по водному балансу (Agosin, Aguilera, 1998).



Process and Instrumentation Diagram of SSC Pilot Plant

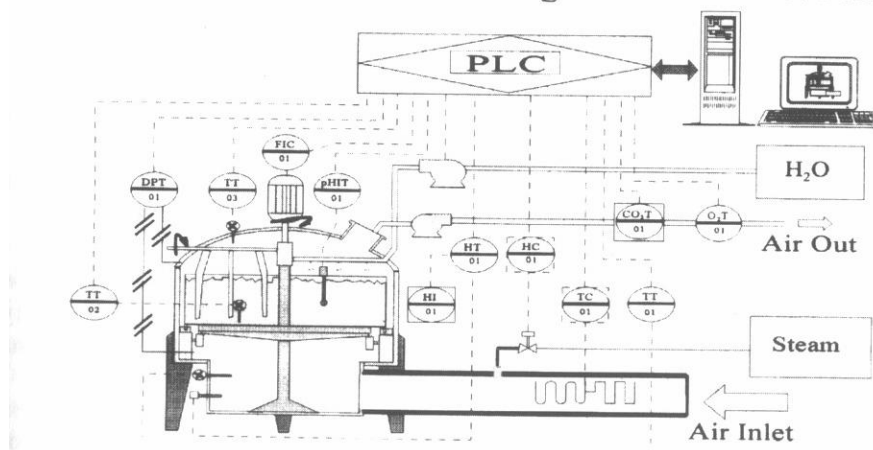


Фото 4.9. Процесс и схема строения пилотной установки для ФТС: (а) предварительный фильтр; (b) винт; (c) очиститель воздуха; (d) охладитель воздуха; (e) рефрижератор; (f) конечный фильтр; (g) электрические нагреватели; (h) бойлерная установка; (i) соленоидная вилка; (j) программируемая контрольная установка; (k) система контроля; (l) воздушный клапан; (m) ФТС реактор; (n) оборудование (CO₂, O₂, вискозиметр, pH, давление, влажность) (фото адаптировано из Agosin, Aguilera, 1998).

Информация о продуктивности производства конидиальной биомассы видов *Trichoderma* в данной установке не указана.

Преимущество 50 кг горизонтального барботажного реактора состоит в том, его можно стерилизовать. На фото 4.9 показаны различные части биореактора:

- крышку можно поднять и герметично закрыть; системы подачи воды и питательных веществ расположены на крышке;
- в реакторе расположена вращающаяся корзина размером 1,2 м; дно корзины перфорировано; размер отверстий составляет 2 мм;
- воздушный клапан расположен под вращающейся корзиной, что позволяет распределять поступающий воздух.

Система кондиционирования воздуха расположена за пределами ферментера и состоит из предварительного фильтра, винта с различными скоростями, охладителя и осушителя и фильтра для стерилизации с размером пор не более 0,25 mm. В системе имеется нагреватель для стерилизации ферментера и генератор пара для регулирования влажности поступающего воздуха.

Вращение корзины обеспечивается благодаря соединению мотора и рукояток корзины. Система увлажнения статична и снабжена двумя стержнями, которые также способствуют перемешиванию. Корзина снабжена колесиками. Воду и питательные вещества можно подавать периодически через три отверстия.

Программируемый логистический контроллер (PLC) представлен модулями входа и выхода, компьютерным интерфейсом и используется для контроля в непрерывном режиме. В процессе ферментации контролируются такие параметры, как температура (ТТ), влажность воздуха (НТ), концентрация CO₂ в воздухе (CO₂ Т), давление воздуха (DPT) и скорость подачи воздуха. Также измеряются концентрации O₂ и pH.

Систему контроля температуры и содержания воды следовало автоматизировать. Для этой цели авторы разработали специальное программное обеспечение и оборудование, что позволило визуализировать процесс ферментации в виде графиков. Используя интерфейс, процесс можно регулировать вручную или автоматически. Разработаны удобные алгоритмы, что позволило оперировать процессом с помощью клавиатуры.

В подобном реакторе была достигнута продуктивность с 10⁹ до 10¹⁰ конидий на кг в час. Субстратом служил вермикулит, пропитанный средой на основе кукурузного экстракта. Даже эти показатели были значительно ниже полученных в лаборатории. Однако продуктивность получения конидий можно увеличить путем оптимизации среды и подбора условий биореактора, особенно важно перемешивание.

Процессы после ферментации. После ФТС необходимо разделить конидиальную биомассу и содержащую споры среду. Споры можно использовать непосредственно как конечный продукт, как в большинстве процессов производства продуктов питания. С другой стороны споры можно высушивать воздухом во время ферментации. Процесс продолжают, пока влажность не снизится до 10% по сухому весу, но споры останутся жизнеспособными. Сухой препарат особенно удобен, когда его собираются вносить в почву (Agosin, Aguilera, 1998).

Сохранение качества сухого коммерческого биопестицида

Для того чтобы коммерческий продукт был эффективным, биологический агент должен переносить процессы после ферментации, оставаться стабильным при хранении и сохранять свои свойства в полевых условиях.

Т а б л и ц а 4.6

Главные постферментационные процессы обработки коммерческого биопродукта

Цель	Процесс	Процессы, критические для выживания спор
Сепарация	Центрифугирование, фильтрация, продавливание, размалывание	Разрушение, длительное время, нагревание
Стабилизация	Концентрация, гранулирование, сушка, капсулирование	Нагревание, разрушение, перемешивание, осмотический стресс
Сохранение	Приготовление препарата, упаковка, хранение	Температура, время, влажность
Выживание	Растворение, адгезия	Питательные элементы, природные стрессы (УФ, температура и т.д.)

Хорошие результаты, полученные в лаборатории, еще не гарантируют успешное производство на коммерческом уровне. Качество реагентов, технологию управления и контроля трудно воспроизвести в промышленном масштабе. Например, коммерческое производство часто требует последующей обработки продукта. Если новый продукт переносится из лаборатории на производство, он должен прежде быть испытан в самых разных условиях. Следует провести испытания на пилотном оборудовании. Применяв данные лабораторных опытов, можно подобрать условия и оборудование, необходимые в промышленном производстве. Следует проверить, как различные условия производства влияют на жизнеспособность высушенного биопестицида (табл. 4.6) (Agosin, Aguilera, 1998).

Некоторые факторы производства, влияющие на время сохранности продукта

Консервация с помощью сушки применялась с самого начала прошлого столетия и была дешевле, чем замораживание. Высушивание при контроле содержания воды является критической операцией в производстве сухого биопестицида. Редко кто принимает во внимание, что устойчивость биоконтрольного агента к высушиванию также зависит от штамма, состава среды, культивирования, условий сепарации. Это все показано для успешного продукта сухих микроорганизмов, таких, как хлебопекарные дрожжи. Следует учитывать некоторые факторы, которые влияют на сохранность *T. harzianum* (Agosin, Aguilera, 1998).

Индукция стрессовых защитных факторов

Для того чтобы коммерческий продукт был эффективным, большинство спор должно выдерживать высушивание и успешно прорасти из высушенного состояния. Повышенное выживание некоторых организмов при обезвоживании связано с накоплением некоторых сахаров, в основном трегалозы, которая служит защитным фактором белков и мембран. Трегалоза представляет собой неметаболизируемый дисахарид (1- α -D-глюкопиранозил-1,1- α -D-глюкопиранозид), который обнаруживается у грибов, бактерий и животных. Установлена строгая корреляция между содержанием трегалозы и устойчивости к стрессам *in vitro* и *in vivo*. Толерантность к обезвоживанию спор *T. harzianum* коррелировала с содержанием трегалозы (Harman *et al.*, 1991). Однако существует несколько работ, в которых такая корреляция не была выявлена (Agosin, Aguilera, 1998). Показано, что кривую роста спор *T. harzianum* P1 в жидкой среде можно разделить на экспоненциальную стадию споруляции (ESS) между 20 и 50 часами ферментации, и стационарную фазу споруляции (SSS), после которой концентрация остается постоянной. Споры, полученные в конце SSS, более устойчивы к сушке, чем споры, полученные на стадии ESS. Содержание трегалозы в SSS спорах почти в 20 раз выше, чем в спорах ESS. Среди всех факторов индукции самым эффективным оказался термический шок (40°C, 90 мин), который увеличивал содержание трегалозы в 2,5 раза выше по сравнению с необработанными спорами. Существуют некоторые свидетельства того, что при метаболической активизации спор происходит мобилизация трегалозы (например, при переходе к высокой влажности и оптимальной температуре).

Считается, что гидрофобность клеточной поверхности, обеспеченной белками типа гидрофобина, в случае ФТС, также играет определенную роль в развитии устойчивости к обезвоживанию спор *T. harzianum*. В настоящее время получена трехмерная структура гидрофобина HFBI из *T. reesei* (Linder *et al.*, 2005). Есть несколько сообщений о цитоплазматических белках, ассоциированных с устойчивостью к нагреванию семян, в том числе о белках позднего эмбриогенеза (LEA), осмотинах и дегидринах, которые индуцируются в результате водного стресса или при обезвоживании. Некоторые LEA, возможно, обеспечивают стабильность

растворимых сахаров, обеспечивающих защиту от стрессов. В настоящее время изучается возможность накопления белков теплового шока или дегидринов в клетках *T. harzianum*.

Повреждения в процессе сушки

В процессе сушки происходит естественная потеря жизнеспособности вследствие того, что исчезает вода, связанная с ДНК, РНК и белками клеток. Однако показано, что, прежде всего, страдают мембраны. Возможно, что и другие факторы снижают жизнеспособность спор при длительном нагревании и сушке путем распыления, вследствие чего, возникающие силы напряжения могут повредить клетки. Возможно, так получилось, что выбор пал на промышленное оборудование, значительно отличающееся по данным параметрам от лабораторного оборудования. В лаборатории для сушки используются замораживание, а не распыление с нагревом. Гранулированный продукт можно получать путем перемешивания концентрированной суспензии спор до образования комков, которые затем продавливают через фильтр, формирующий гранулы. Гранулы затем высушиваются воздухом на лотковом испарителе. Преимуществом такого метода сушки является то, что температуру и время сушки можно контролировать независимо, поэтому этот метод рекомендуется для сушки микроорганизмов (Agosin, Aguilera, 1998).

Остаточная влага (ОВ)

Стабильность микроорганизмов и биологических молекул после сушки часто изучается в зависимости от температуры, pH, разных добавок, допуская при этом, что остаточная влага остается постоянной. На практике процессы дегидратации, как в лаборатории, так и на производстве, приводят к большим количествам ОВ. Даже при холодной сублимации, чтобы значения ОВ составляли менее 0,05 г на г сухого веса, требуется провести десорбцию воды и предотвратить контакт пробы со средой. Поскольку в производстве пищевых продуктов и биологических материалов редко достигаются «экстремально низкие» значения остаточной воды, то эффекты ОВ не ясны для технологов и инженеров (Agosin, Aguilera, 1998).

Еще ранее было показано, что снижение ОВ сухих культур увеличивает степень выживания при хранении. Однако, данные о выживаемости бактерий (так же, как и других микроорганизмов) трудно сравнивать, поскольку следует учитывать много факторов: природа организма, штамм, среда для роста, условия роста, возраст культуры и физиологическое состояние пропагул, метод сушки и некоторые ключевые параметры (в том числе степень высушивания), остаточную влажность и условия хранения. Активность воды (a_w) определяется как отношение парциального давления воды в материале к давлению пара чистой воды при такой же температуре, рассчитанное по формуле. Лучше всего описывать физико-химическое состояние воды в гигроскопичных материалах, содержащих влагу, через изотерму сорбции. Жизнеспособность высушенных путем распыления *Rhizobium* после 45 недель хранения при 4°C и $a_w < 0,23$ была в 3 раза выше, чем образцов, хранившихся при $a_w = 0,44$. Увеличение температуры до 20°C привело к резкому снижению степени выживаемости образцов, хранившихся при $a_w = 0,44$. 0,75 0,87. Тогда как выживаемость образцов, хранившихся при $a_w = 0,03$ (силикагель) и 0,11 при повышении температуры увеличилась. Однако с материалами с низкими ОВ трудно работать, они создают пыль и физические проблемы. Таким образом, тщательный контроль и поддержание низких значений ОВ (даже после сушки) при хранении оказывает положительный эффект на жизнеспособность продукта (Agosin, Aguilera, 1998).

Оценка срока годности коммерческого продукта

Срок годности считается главным фактором, определяющим коммерческий успех биоконтрольного агента так же, как и эффективность агента в полевых условиях.

Рекомендуемый срок годности для сельскохозяйственного рынка с условием минимальных потерь жизнеспособности составляет 18 месяцев. Хотя такой срок соблюдается в редких случаях, поскольку на него оказывает влияние температура и влажность. Наиболее часто испытывается стабильность продуктов питания и фармацевтических препаратов при высоких температурах и влажности для оценки срока годности продуктов. Этим способом можно получить данные в течение нескольких дней и недель, и не ждать несколько месяцев, чтобы оценить срок годности при условиях хранения. Данные, полученные при таком ускоренном тестировании экстраполируются на условия реального хранения с использованием связанных со значениями температуры моделями, такими, как Q_{10} или энергия активации (E_a), или уравнение Аррениуса. Однако, существует большое число практических и теоретических ошибок, которые следует исключать перед тем как переносить данные ускоренных опытов на реальную ситуацию, таких, как существование сцепленных реакций, изменение механизмов при высоких температурах, недостаточное количество данных для расчета E_a или замеры через стекло (Agosin, Aguilera, 1998).

Математические модели

Основное заключение состоит в том, что существует набор параметров, которые влияют на качество (Q) продукта (в нашем случае это жизнеспособность), и которые можно измерить. Количественный анализ далее требует взаимодействия между изменениями качества в течение времени (t) и этими факторами (F_i) по формуле: (1):

$$\frac{dQ}{dt} = f(F_1, F_2, \dots, F_n).$$

Более того, необходимо знать, как эти факторы изменяются во времени. Например, температура обычно является ключевым фактором для стабильности биологических материалов, и, хотя часто считается постоянной в контролируемых экспериментах, она может колебаться в течение суток или сезона. Влияние влажности, другого важного параметра, который влияет на скорость реакции, выражается как активность воды. Этот подход ныне успешно применяется для оценки стабильности продуктов питания и лекарств. Поскольку большинство изменений качества при хранении продукта происходит благодаря химическим реакциям, самая простая и широко используемая эмпирическая модель выражается формулой (2):

$$\frac{dQ}{dt} = \pm kQ^n,$$

где k – константа скорости и n – порядок реакции (обычно от 0 до 1 для продуктов питания и лекарств). Эта модель полностью описывает важные механизмы, участвующие в процессе при различных степенях, при которых данные могут интегрироваться при различных значениях n (2). На практике параметр Q ведет себя как функция от времени в адекватной системе координат (логарифмический график, реакции первого порядка), высокая степень значимости (r^2) установлена разными методами статистики. Обычно более 50% прохождения реакции требуется для генерации данных для получения определенного значения n (Agosin, Aguilera, 1998).

Считается, что воздействие влажности и температуры можно выразить через константу k . Наиболее используемой моделью является уравнение Аррениуса, описывающее зависимость k от T (3):

$$k = k_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right),$$

где k_0 – пре-экспоненциальный фактор, R – константа идеального газа, и E_a – энергия активации. Если график зависимости $\ln(k)$ от T^{-1} линейный, можно применять уравнение Аррениуса, и энергия активации остается постоянной в некотором интервале

температур. По крайней мере, требуются данные при четырех температурах, чтобы подтвердить линейность функции. Колебания функции при изменении температуры могут свидетельствовать об изменении механизмов реакции (или просто данных мало). В случае продуктов с низким содержанием влаги, находящихся в безжизненном состоянии, удобнее использовать уравнение Вильямса – Ландела – Ферри для того, чтобы описать вариации температуры (4):

$$\log \frac{k_{ref}}{k} = \frac{-C_1(T - T_{ref})}{C_2 + (T - T_{ref})},$$

где C_1 и C_2 – константы, зависящие от материала; T_{ref} – относительная температура, обычно температура перехода к безжизненному состоянию. Влияние влажности на стабильность продукта установлено и выражено через активность воды. На первом этапе следует установить линейную зависимость между константой скорости и активностью воды (5):

$$\ln k = \alpha a_w.$$

Данное уравнение требует учета взаимодействия между содержанием влаги m (g воды на g сухих спор), и активностью воды (как константа T). Такая функция называется изотермой сорбции. Наиболее частой формулой для расчета изотермы является (6):

$$m = \frac{m_0 K C a_w}{(1 - K a_w)[1 + K(C - 1)a_w]}.$$

Суммировали уравнение (3) и (5), чтобы выразить комбинированную зависимость константы скорости от температуры и активности воды (7):

$$\ln k = \alpha_1 + \frac{\beta}{T} + \gamma a_w + \delta \frac{a_w}{T},$$

где α, β, γ и δ – константы для применения методов статистики, например, в случае нелинейной регрессии (Agosin, Aguilera, 1998).

Пример: Жизнеспособность сухого препарата *Trichoderma* при хранении

Для иллюстрации применения математических моделей на практике, авторы использовали результаты изучения жизнеспособности спор *T. harzianum*.

Основные математические модели, позволившие предсказать потери жизнеспособности спор *T. harzianum* при хранении (Agosin, Aguilera, 1998)

Общее выражение снижения жизнеспособности со временем (V остаток в %)

$$\ln V = \ln(100) - kt$$

$$\ln k = 70.2 - \frac{2.3 \times 10^4}{T} - 42.7 a_w + \frac{1.46 \times 10^4}{T} a_w$$

сорбционная изотерма:

$$\frac{a_w}{m} = -37.8 a_w^2 + 32. a_w + 2.43$$

Экспериментальные данные и кинетика изменений относительной жизнеспособности (V) образцов при 42, 33 и 8°C и различных значениях a_w показаны на рисунке 4.10. Для предсказания изменений жизнеспособности со временем успешным было построение уравнения первого порядка, которое показало, что изменения не приведут к гибели. Никакой кинетики не было получено при 8°C и при самых низких значениях a_w V не изменялась (рис. 4.10). Жизнеспособность

T. harzianum резко снижалась при повышении температуры и a_w . На рисунке 4.10 показано, что максимальной жизнеспособностью обладали споры, хранящиеся при 8°C и самой низкой активности воды. При этой температуре, близкой к температуре холодильника, эффект a_w от 0,03 до 0,33 на жизнеспособность спор был незначителен, но влиял негативно при значениях выше 0,75. При 33°C свыше 70% спор при a_w 0,03 оставались жизнеспособными после 110 дней хранения. Авторы подтвердили адекватность модели при 33°C и a_w 0,89 и 42°C при хранении 18 суток (после этого сохранность спор была менее 1%). Все эти условия послужили для разработки ускоренного теста образцов в условиях прежнего хранения. Результаты показали, что медленное высушивание и хранение в условиях низкой влажности ($m < 4\text{г/г}$) позволяет получить сухие споры со сроком годности в несколько месяцев при хранении в герметичной упаковке при температуре ниже 20°C (Agosin, Aguilera, 1998).

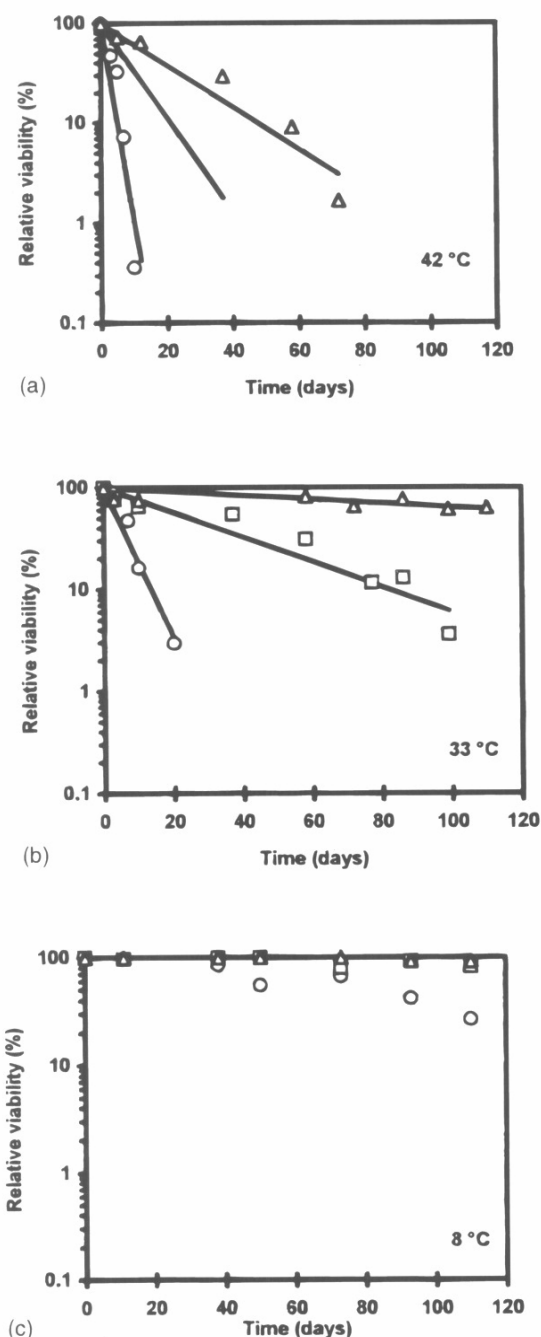


Рис. 4.10. Кинетика изменения относительной жизнеспособности спор *T. harzianum* во время хранения при 42, 33 и 8°C. Символы отражают экспериментальные значения константы a_w (○=0.75, □ = 0.33, Δ =0.03), и линии отражают модель (рис. адаптирован из Agosin, Aguilera, 1998).

4.6.3. Препаративные формы биофунгицида на основе *Trichoderma* в России

Основные препаративные формы триходермина, используемые в России, – это сухой и жидкий (влажный) препараты. Жидкая форма обладает, как правило, более высокой жизнеспособностью спор, не переносится воздушными потоками, кроме того, при ее производстве не требуются затраты на высушивание. Однако хранится такой препарат не более 2 недель при температуре не выше 12 °С (Штерниш и др., 2004).

Триходермин, Ж. Препарат на основе *T. viride*, штамм ТВД-93. Титр не менее 1 млрд спор в 1 г. Применяют для полива растений огурца от корневых гнилей (15-25 л/га) и для опрыскивания черенков гвоздики от фузариозного увядания (6-8 л/га).

Триходермин, Г. Препарат на основе *T. viride*, штамм ТВД-93. Титр 2 млрд спор в 1 г. Применяют в защищенном грунте для обработки семян огурца (50 г/кг) и внесения в лунки при высадке рассады из расчета 2 г на одно растение (Штерниш и др., 2004).

Триходермин-С. Препарат разработан в Красноярском госуниверситете в условиях иммерсионного культивирования (Громовых, 2002). Это порошок чистых спор без примеси мицелия. Титр 6×10^{10} в 1 г препарата. Предпосевная обработка семян пшеницы и ячменя привела к снижению заболеваемости грибом фузариозом, гельминтоспориозом и корневой гнилью, вызываемой грибом *Bipolaris sorokiniana*.

Первоначально триходермин использовали в открытом грунте для борьбы с корневыми гнилями пшеницы и ячменя, более широкое применение он нашел в защищенном грунте. При защите растений от почвенных патогенов наиболее эффективна обработка семян перед посевом. За 1-3 дня до посева их опудривают спорово-мицелиальным порошком.

Однократная интродукция триходермина не всегда обеспечивает достаточную эффективность, что вызывает необходимость многократного применения препарата.

Первые исследования по возможности применения триходермина для защиты от болезней надземных органов проведены в МГУ и НИИ овощного хозяйства Г.Д. Успенской и Н.Н. Гринько в 80-е годы XX в (Гринько, Успенская, 1987). Был предложен прием защиты надземных органов от комплекса болезней. Он заключается в профилактическом опрыскивании растений мицелиально-споровой суспензией препарата на основе штамма *T. harzianum*, выделенного авторами из филлопланы огурца. Такая заблаговременная интродукция гриба-антагониста на листья, препятствуя внедрению патогенов листовой поверхности в ткань растения-хозяина, не дает развиваться инфекционному процессу. Для лучшей фиксации триходермина на листьях добавляют карбоксиметилцеллюлозу. В результате резко снижается пораженность огурца аскохитозом, серой и белой гнилями, бурой пятнистостью.

При опрыскивании томатов триходермином задерживается развитие таких заболеваний, как белая и серая гнили, вертициллезное увядание, альтернариоз и кладоспориоз. Кроме того, разработан и предложен производству способ защиты огурца и томата от стеблевых гнилей с использованием пасты триходермина на основе *T. harzianum* Rif. Совместное использование этого препарата с бактофитом или планризом приводило к подавлению развития возбудителей настоящей и ложной мучнистой росы огурца. Есть данные об успешном использовании препарата на основе гриба *T. koningu* Oud. против южной галловой нематоды (Штерниш и др., 2004).

Триходермин, У. Н.Н. Гринько (Гринько, 2004) разработаны две формы препарата на основе *T. harzianum* ВКМ F-2477 Д: спорово-мицелиальный порошкообразный и зерновой с остатками питательной среды (рис.4.11).

Триходермин в форме порошка целесообразно интродуцировать в филлоплану и на семена овощных культур; зерновой – в ризосферу, а после размалывания – инокулировать пораженные гнилями стебли растений (Гринько, 2000).

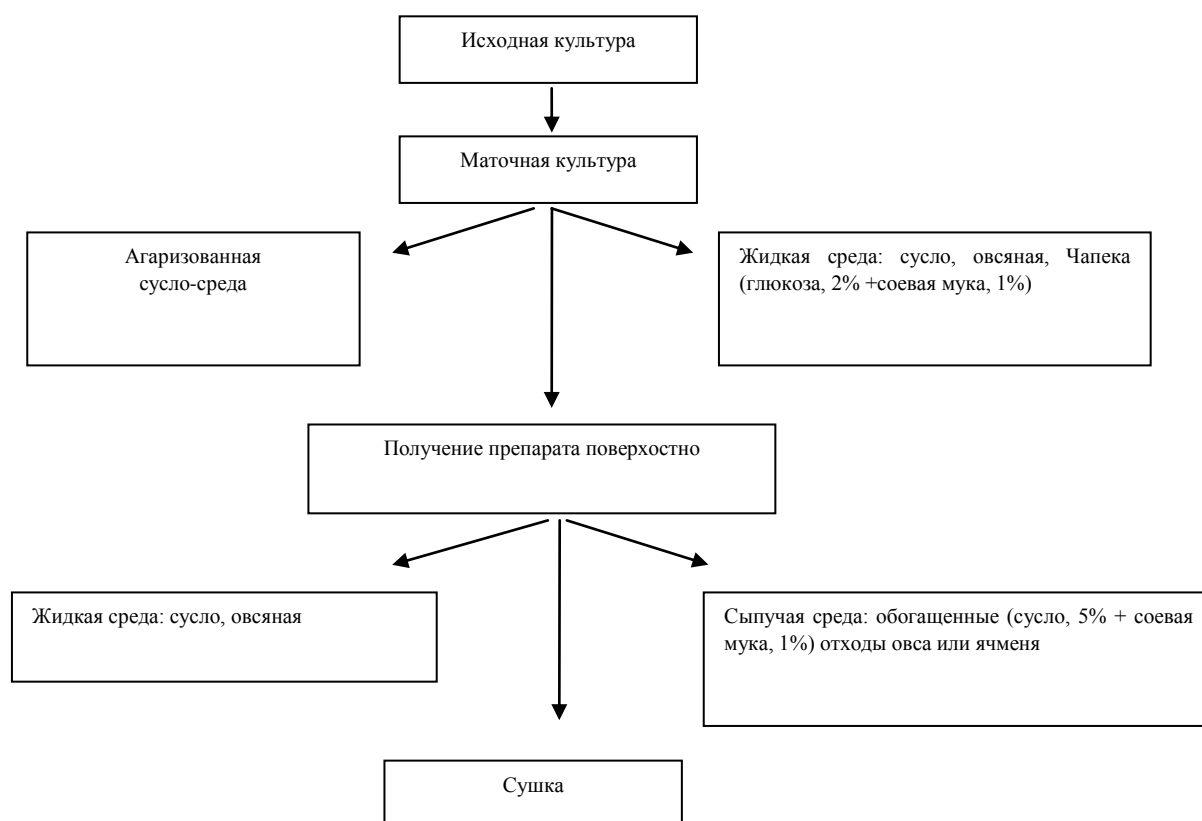


Рис. 4.11. Схема получения триходермина У (Гринько, 2004).

Л.В. Коломбет с соавторами (Коломбет и др., 2001) создали микофунгицид на основе *T. asperellum* (штамм №16). По уточненной классификации этот вид относится к виду *Trichoderma asperellum* Samuels (Коломбет и др., 2005). Мицелиальный препарат способен сохранять свою активность в течение 6 мес. Препарат совместим с инсектицидами (карбофосом, висметрином, талстаром, апплаудом) и некоторыми фунгицидами (байтаном). Испытания жидкой формы микофунгицида показали его высокую эффективность в защите зерновых культур от возбудителей болезней при предпосевной обработке семян дозой 20-30 г препарата на 1т. при этом снизилась заболеваемость растений на 65%, а урожайность увеличилась на 15-20% (Коломбет и др., 2001).

Затем была разработана система комбинированной предпосевной обработки семян пшеницы препаратом Микол на основе гриба *Trichoderma asperellum* с обработкой колосьев *Cryptococcus nadoensis* ОН 182.9 (Коломбет и др., 2005). Такая обработка достоверно повысила всхожесть, энергию прорастания семян и увеличила урожайность.

Binab T представляет собой смесь *Trichoderma harzianum* (АТТС 20476) и *Trichoderma polysporum* (АТТС 20475). Препарат предназначен для контроля внутреннего разрушения древесины построек, декоративных и лесных деревьев. Обработанная древесина не должна использоваться в пищевой и кормовой промышленности.

На 2002 г. наиболее известными препаратами являлись: Harzian 20 (France),

Promote/Promot Plus (USA, Canada), Root Pro (Israel), PlantShield, RootShield (R) Granules, TurfShield, T-22 Planter Box (USA), TRI 002/003 (Netherlands), Trichodex (Israel), Trichodowels Trichoject, Trichopel, Trichoseal (New Zeland) и Trisan (Thailand). *T. harzianum*, входящая в состав этих препаратов, используется для контроля *Chondrostereum purpureum* и других базидиомицетов таких, как *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* и *Sclerotium*. Помогает для защиты ран деревьев от разрушения и повышает развитие растительной ткани с помощью ауксин. Используют для супрессии заболеваний растений и при хранении фруктов и овощей.

4.7. Применение *Trichoderma* для переработки отходов

4.7.1. Получение биокомпостов с применением *Trichoderma*

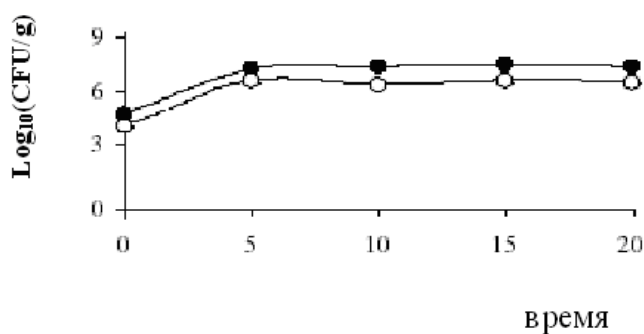
Компостирование – это экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биodeградации смешанной популяцией микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности. В процессе биodeградации органический субстрат претерпевает физические и химические превращения с образованием стабильного гумифицированного конечного продукта.

Внесение сырых органических отходов в любую экосистему может создать серьезные экологические проблемы. Известно, что интродукция в агроценозы биокомпостов благотворно влияет на супрессивность почв, обеспечивает питательными веществами, снижает засоление, повышает стабильность почвы и способность к удерживанию влаги. Для получения компостов используются различные субстраты растительного и животного происхождения, в том числе промышленные, бытовые и сельскохозяйственные отходы. Для увеличения скорости получения биокомпостов применяются различные: химические, растительные и микробиологические добавки (бактерии, грибы).

Компостирование растительных отходов с использованием *Trichoderma*

В России, как и в других странах, в сельскохозяйственной биотехнологии образуется большой избыток соломы хлебных злаков и других растительных отходов.

В Испании протестированы несколько лигноцеллюлолитических гриба на способность роста на сельскохозяйственных отходах с целью получения инокулята для компостирования (Vargas-García et al., 2005). В качестве субстратов для биокомпоста исследованы отходы растения перца и остатки оболочки миндаля. Последние, как показали результаты, оказались самым адекватным субстратом для роста тестируемых грибов. Изменение аэрации и pH существенно повлияло на рост *Coriolus versicolor*, и *Phanerochaete flavido alba* и *Phlebia radiata*, соответственно. *P. flavido alba* был единственным микроорганизмом, чей рост не был значительно изменен температурой. *T. koningii* показал лучший рост в стерильных условиях по сравнению с ростом в смешанной культуре (рис. 4.12).



- Рис. 4.12. Рост *T. koningii*;
○ рост в смешанной культуре,
● рост стерильной культуры.

В другой работе показано, что не центрифугированный раздробленный шлам пальмового масла (разбавляли на 50% водой) поддерживал хороший рост мицелия *Myceliophthora thermophila* и *Trichoderma harzianum* (Vikineswary et al., 1997). При этом изолят *T. harzianum*, показавший крахмал расщепляющую активность, произвел 24.4 г/л биомассы мицелия. В то время как *M. thermophila* показал целлюлолитическую и липолитическую активности.

Внесение видов *Trichoderma* продуцентов целлюлаз в почву

Проблема снижения урожайности зерновых из-за образования микроорганизмами фитотоксичной уксусной кислоты в анаэробных условиях при биодegradации соломы хорошо известна в настоящее время. Множество современных исследований посвящено тому, чтобы с помощью микроорганизмов ускорить или переориентировать этот процесс. Представляется возможным промышленное получение многих целлюлолитических грибов и внесение их в пашню для ускорения биодegradации соломы в почве путем разбрызгивания в момент запахивания соломы. В этом случае токсичный уровень уксусной кислоты будет достигнут раньше и, следовательно, раньше потреблен почвенными микроорганизмами, так что к моменту осеннего сева зерновых влияние фитотоксинов будет снижено. Множество грибов, обнаруженных как в гниющей соломе, так и в почве, проявляют целлюлолитическую активность и могут быть использованы для этой цели.

При гниении соломы (преимущественно в анаэробных условиях), оставленной на почве, может происходить накопление фитотоксических соединений (низкомолекулярные жирные кислоты, соли уксусной, пропионовой, масляной кислот). При аэробной дegradации отмечено выделение рост стимулирующих соединений. Солома овса была инокулирована микробным сообществом, содержащим, в том числе и активные целлюлозоразрушающие грибы рода *Trichoderma*. В результате отмечено возрастание скорости дegradации соломы и отсутствие фитотоксических соединений в почве. Исходя из этих предложений, исследовано влияние внесения целлюлолитических грибов в почву на биодegradацию соломы. Было сформировано шесть различных смешанных культур, содержащих грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Chaetomium*. Их добавляли к нарезанной ячменной соломе в общей концентрации 10^6 спор/г соломы. Использование азотфиксирующих микроорганизмов совместно с целлюлолитическими грибами увеличивает скорость биодegradации соломы. Это происходит благодаря тому, что избыточная потребность в азоте в процессе биодegradации соломы целлюлолитическими микроорганизмами может быть восполнена азотфиксирующими микроорганизмами. Поэтому было решено включить такие микроорганизмы в состав пяти из шести грибных культур. 15 г соломы смешали с нестерильными образцами почвы трех различных типов, различающихся по скорости процесса включения в них соломы (влажность 20%), в соотношении соломы к почве 0,15:1, запечатали в пластиковые пакеты и положили в закрытые пластмассовые контейнеры для того, чтобы воспрепятствовать проникновению дневного света. Эти контейнеры были оставлены в нетронутном, состоянии при температуре окружающей среды с сентября по апрель.

Результаты опыта показывают, что для всех шести типов смешанных грибных культур разных типов почвы имеет место определенное, хотя и различное, увеличение

степени биодegradации соломы по сравнению с необработанной соломой. Хотя это предварительные результаты, интересно отметить, что смешанные грибные культуры, которые не содержали азотфиксирующих микроорганизмов, давали наименьшее увеличение биодegradации соломы для каждого типа почвы. Иммуобилизация азота почвы на соломе приводит, вероятно, к тому, что определенные почвенные микроорганизмы не получают адекватного количества азота, что снижает их способность к утилизации продуктов биодegradации соломы. Это ведет к увеличению концентрации фитотоксина. Однако, как и следовало ожидать, через восемь месяцев с помощью газожидкостной хроматографии не удалось обнаружить сколько-нибудь существенного уровня уксусной кислоты ни в водных экстрактах почвы, ни в водных экстрактах соломы.

Практические сложности в применении новой технологии. В идеале итогом исследований должно являться получение одного отдельного штамма целлюлолитического гриба, обладающего наибольшей скоростью биодegradации соломы, однако это только часть решения вопроса. Промышленная крупномасштабная ферментация нового грибного штамма будет зависеть от решений возникающих экономических проблем. Для того чтобы получать максимум биомассы с одной промышленной ферментации, необходимо оптимизировать с помощью множества лабораторных ферментаций значения pH, температуры, уровень потребления кислорода и азота перед тем, как окончательно выбрать условия проведения процесса. До сих пор большинство грибных ферментаций, (в основном это были глубинные ферментации), оптимизировали по максимуму выхода целевого метаболита, например, фермента или антибиотика, а не по максимуму общей биомассы. Кроме того, эта оптимизация должна быть компромиссом между уровнем продукции биомассы и стоимостью ферментации. Фермер не станет покупать этот биологический препарат для «сбраживания в поле», пока он не будет уверен, что это принесет ему доход. Казалось бы, сжигание растительных отходов в поле не дает фермеру ничего, но это неоспорно. С одной стороны, он теряет при сжигании питательные вещества, которые могли бы повысить стабильность и плодородие его земли, кроме того, он должен следить за огнем и учитывать опасность загрязнения окружающей среды. С другой стороны, сжигание соломы в поле уменьшает количество возбудителей болезней растений, а также сорняков. Однако даже если удастся убедить фермеров в эффективности этого метода, это приведет к новым научным и внедренческим проблемам.

Грибной препарат должен сохранять целлюлолитическую активность при высушивании и длительном хранении. Препарат должен добавляться к соломе в больших количествах для обеспечения максимально возможной скорости биодegradации, чтобы в почве не накапливались фитотоксические вещества. К моменту сева в почве должно быть, как можно меньше фитотоксинов. Более того, внесенные грибы должны успешно выдержать конкуренцию с эндогенной микрофлорой почвы. Путь к решению проблем может быть получен только в результате полевых испытаний.

Хотя идея «сбраживания в поле» представляется многообещающей, большинство целлюлолитических штаммов способно утилизировать только легкодоступную целлюлозу, содержащуюся в листьях и узлах соломы. Целлюлоза, содержащаяся в междоузлиях, с трудом усваивается целлюлолитическими грибами. Еще более устойчивой по отношению к целлюлолитической активности является, конечно, лигниновая фракция, которая останется неразложившейся к моменту использования образующегося продукта. Тем не менее, уже существуют исследования, относящиеся к биодegradации лигнина соломы. Даже эта трудная проблема может быть успешно решена в последующие годы.

Интродукция *Trichoderma* продуцентов целлюлаз в почву в составе компостов

В Индии Сайном (Singh, Sharma, 2002) проведены предварительные исследования на соломе пшеницы, для изучения жизнеспособности системы биоинкулированного компоста (растительные отходы с микроорганизмами). Впоследствии эта схема могла бы помочь решению проблемы деградации лигноцеллюлозных отходов, особенно в течение зимнего сезона. Солома пшеницы в опытах Сайна (Singh, Sharma, 2002) была подвергнута предварительному (40 дней) разложению с помощью грибов (*Trichoderma viride*, *T.harzianum*, *T.spirale*, *Aspergillus spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Chaetomium spp.*). Затем в течение 30 дней провели вермикомпостирование. Анализ образцов показал значительное уменьшение содержания целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в течение предварительного разложения и вермикомпостирования. Наряду с получением богатого питательными веществами продукта, наблюдалось улучшение компостирования лигноцеллюлозных отходов в течение зимы. Кроме того, комбинирование обеих систем сократило общее время компостирования.

Титова с соавторами (Титова и др., 2002) для компостирования использовали растительные субстраты (солома и отруби злаковых) после культивирования вешенки. Для компостирования отходов грибоводства и вторичной утилизации субстратов интродуцировали *T. harzianum*. При этом более предпочтительными были субстраты на основе смеси опилок с пшеничными отрубями, первично конвертируемые *Pleurotus ostreatus* (сорт Дон 103).

Компостирование комбинированных отходов животноводческих комплексов и растительных остатков с применением *Trichoderma*

Зайед и Абдель-Мотаал (Zayed, Abdel-Motaal, 2005) для получения компоста инокулировали *Aspergillus niger* и *Trichoderma viride* в рисовую солому, обогащенную неорганическим фосфатом и навозом животноводческих комплексов (НЖК). Конечный компост оценивался как органическое фосфатное удобрение для растений (на примере горошка), высаженных в горшки. Результаты показали, что максимальное значение растворимого фосфора (1000 ppm) получено в компостах, инокулированных *A. niger* + *T. viride*. Любой из полученных компостов был намного лучше суперфосфатного удобрения для обеспечения фосфатом растущих растений. Удобрение растений компостом, инокулированным НЖК + *A. niger* + *T. viride*, привело к максимальному транспорту фосфата (295 ppm). Наибольшее число грибов, растворяющих фосфаты, в ризосфере растений было достигнуто после удобрения компостом, обработанным *A. niger* и *T. viride*, в то время как наибольшее число бактерий, растворяющих фосфаты, было получено в результате удобрения почв компостом, содержащим НЖК.

В Египте исследовалось влияние компоста и укрывания соломой ржи на урожайность сельскохозяйственных культур и развитие сорняков при пересадке растений (Hégaux et al., 2005). Для инокулирования куриного помета (КП) использовали *Trichoderma virens*, которая выделяет вирудиол, характеризующийся гербицидной активностью. Солома ржи, используемая для укрывания растений, также выделяла соединения (3Н)-бензоксазолин (БОА) и 2,4-дигидрокси-1,4-(2Н)бензоксазин-3-он (ДИБОА) с гербицидной активностью. Авторами было показано, что использование КП и покрытия соломой ржи пересаженных овощных культур обеспечило защиту от сорняков и повышение урожайности.

Разработана технология ускоренного процесса биокомпостирования торфо-пометной смеси на основе использования активной и устойчивой микробной ассоциации. Ассоциация представлена микроорганизмами, которые доминируют в сообществе торфо-пометной смеси на разных стадиях биокомпостирования. Выделенные штаммы принадлежали к родам *Trichoderma*, *Monoascus*, *Botrytis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Azospirillum*, *Paecilomyces*. Компост на основе предложенной ассоциации угнетал рост гнилостных и условно патогенных

микроорганизмов, повышал содержание доступного углерода за счет ферментативного гидролиза целлюлозы и лигнина. Урожай клубней картофеля в условиях Владимирской области, полученный при внесении 5,8 т/га компоста, превышал урожай, полученный при внесении 40 т/га подстилочного навоза, прибавка урожая к контролю была соответственно 43% и 37% (Дурынина, Пахненко, 2004). Использование торфо-пометной смеси на основе микроорганизмов-биоактиваторов: *Monoascus ruber*, *Trichoderma asperellum*, *Azospirillum* sp. и микроскопических дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при внесении в дерново-подзолистую тяжелосуглинистую почву: (рН 5,6, Нобщ.-0,08%, P₂O₅ подв.- 17,7мг, K₂O- 11,0 мг на 100 г почвы) позволило увеличить урожай ярового ячменя сорта «Биос» на 40% (в контроле – 16,5 ц/га). Применение минеральных удобрений (N90P90K60) – 49,1% (Кокшарова, Пахненко, 2005).

Компостирование промышленных и бытовых отходов с применением *Trichoderma*

Помимо отходов сельского хозяйства основой биокомпоста могут являться илы сточных вод. К примеру, было исследовано использование компоста ила сточных вод и изолятов *Trichoderma asperellum* для репрессии возбудителей фузариозного вилта томатов (Cotxarrera et al., 2002). Компост, приготовленный на растительных и животных отходах ила сточных вод и бытовых отходов, показал высокую способность к супрессии этого заболевания, вызванного *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici race 1*. Способность компоста подавлять фузариозный вилт томатов была сравнена по этому критерию с торфяной смесью и натуральной супрессивной почвой из Шаторенард, Франция. Компост и почва из Шаторенард были высокосупрессивными. Авторами показано, что внесение этого компоста значительно (P<0.05) увеличивало супрессивность торфяной смеси. Были сравнены биотические и абиотические свойства этих субстратов. Торфяная смесь была кислой и имела низкий уровень ЕС, тогда как компост был щелочным и с высоким ЕС. Хотя смесь компоста с торфом имела рН схожий с компостом, ее ЕС составил половину от значения для компоста.

Бактериальные популяции и микробная активность были наиболее высокими в компосте и в компост-торфяной смеси. Натуральный компост и изоляты *T. asperellum* значительно (P<0.05) увеличили супрессивную способность стерильных компост-торфяной смеси и почвы. Авторы показали, что использование компостированного ила сточных вод в среде роста растений эффективно для супрессии фузариозного вилта на раннем этапе роста растения. К тому же изоляты *T. asperellum*, выделенные из супрессивной компост-торфяной смеси, как оказалось, обладают потенциальными возможностями к тому, чтобы стать новым альтернативным средством биологического контроля фузариозного вилта.

Непатогенный вид *F. oxysporum* Fo47, выделенный из почвы Шаторенард, был сравнительно самым эффективным биоконтрольным агентом. Конкуренция за питательные вещества является главным механизмом биологического контроля этим штаммом, хотя возможны конкуренция за колонизацию корневой поверхности и ткани, и индукция системной резистентности. Пораженность фузариозным вилтом растений томата, выращенных в стерильных компост-торфяной смеси и почве Шаторенард, инокулированных этим штаммом, была наименьшей. Штаммы *Trichoderma asperellum*, изолированные из компоста, эффективно подавляют болезнь, вызванную *Fusarium oxysporum*. Авторы показали, что использование компостированного ила сточных вод в среде роста растений эффективно для супрессии фузариозного вилта на раннем этапе роста растения. К тому же изоляты *T. asperellum*, выделенные из супрессивной компост-торфяной смеси, как оказалось, имеют потенциал к тому, чтобы быть новым альтернативным препаратом для биоконтроля фузариозного вилта (Cotxarrera et al., 2002).

Вероятно, высокое значение рН в исследуемом компосте, компост-торфяной

смеси и почве Шаторенард могло содействовать подавлению *Fusarium*, так как высокий рН уменьшает доступность таких элементов, как Fe, Cu, Zn. Высокий ЕС или содержание соли в компосте и смеси компоста также могло уменьшить выживание патогена. Концентрация тяжелых металлов в компосте была ниже установленных пределов ПДК и ниже концентрации, обладающей фунгицидным эффектом на *Fusarium oxysporum*. Высокий рН компоста и компост-торфяной смеси может уменьшить доступность этих металлов. Однако, только эффект воздействия меди на патоген не может быть основной причиной фунгицидного эффекта, так как только двойная доза этого элемента от количества, полученного в компосте, оказывает сильный фунгицидный эффект на *Fusarium oxysporum* (Cotxarrera et al., 2002).

С другой стороны, поскольку серьезность болезни и зараженность возрастали при нагревании или стерилизации компостно-торфяной смеси, подавление этой болезни могло быть обусловлено действием микрофлоры естественной смеси. Другие исследования показали роль естественных биотических свойств компоста в подавлении болезни. Сравнение важных биологических свойств супрессивного компоста, компостно-торфяной смеси и естественной торфяной смеси с положительными свойствами показало, что популяция бактерий значительно выше в супрессивном, чем в последнем типе субстрата. Компост и компост-торфяная смесь показали высокую микробную активность. Тем не менее, значение микробной активности в торфяной смеси было ниже, чем для компоста и компостно-торфяной смеси. Микробная активность – ключевой показатель подавления фузариозного вилта. Показана супрессивная активность субстрата или почв, содержащих органические вещества, по отношению к болезням, вызванным многочисленными почвенными растительными патогенами, такими, как *Pythium ultimum*, *Phytophthora spp.* и *Pyrenochaeta lycopersici*. Во всех субстратах, использованных в этой работе, микробная активность была за порогом, установленным для подавления *Pythium spp.* (Cotxarrera et al., 2002).

Увеличение подавляющей активности торфяной смеси после добавления компоста показало, что супрессивность может быть передана из компоста с микробоцидными свойствами к фитопатогену в благоприятный субстрат. Добавление 10% компоста в стерильную компост-торфяную смесь обеспечило подавление болезни. Тем не менее, подавляющая активность натуральной почвы из Шаторенард была выше, чем в засеянной стерильной почве после добавления компоста (почвенная микрофлора была более эффективной, чем микрофлора компоста в подавлении фузариозного вилта). Эти результаты подтвердили важность микрофлоры компоста для супрессивности. Изоляты *T. asperellum*, изолированные из супрессивной компостно-торфяной смеси, были способными индуцировать супрессивность в компосте и в почве. Тем не менее, некоторые из них оказались более эффективными при введении в компост, из которого они были выделены. Эти результаты могут быть связаны с недостатком колонизации почвы изолятами *Trichoderma* или изменением в их метаболизме, влияющем на их взаимодействие с патогеном. Эффективность изолятов *T. asperellum* в подавлении фузариозного вилта оказалась выше, чем других видов *Trichoderma*, заявленных как агенты биоконтроля. Комбинированное инокулирование *T. hamatum* и *Flavobacterium balustinum* было нужно для контроля фузариозного вилта редиса. Эти результаты демонстрируют потенциальную активность этих изолятов как агентов биоконтроля (Cotxarrera et al., 2002).

В итоге результаты показали, что использование компостированного ила сточных вод может быть эффективно для подавления фузариозного вилта. Внесение 10% такого компоста требуется для появления супрессивности в благоприятном для болезни компосте или в почвенной среде. Несколько изолятов *T. asperellum* из подавляющей смеси показали высокую активность в подавлении фузариозного вилта в компосте и почвенной среде. Некоторые из этих изолятов показали большую активность в индуцировании подавления болезни, чем внесение 10% компоста. Тем не

менее, непатогенный *F. oxysporum* Fo47 был даже более эффективным, чем эти изоляты. Подавление фузариозного вилта таким компостом, кажется, является результатом комбинации абиотических и биотических факторов, таких, как низкая концентрация аммония, немного высокий ЕС, большие популяции бактерий и высокая микробная активность.

Дальнейшие исследования *T. asperellum* показали, что внесение штамма Т34 в прикорневую зону томатов способствует индукции системной устойчивости растения к *F. oxysporum* и *Rhizoktonia solani* (Trillas et al., 2006).

Для повышения эффективности компостирования городских твердых отходов используют смесь микроорганизмов (Molla et al., 2004; Xi et al., 2005). Китайские исследователи использовали Инокуль А (смесь *Bacillus azotofixans*, *B. megaterium* и *B. mucilaginosus*), Инокуль В (смесь эффективных целлюлолитических видов, таких, как *Trichoderma koningii*, *Streptomyces cellulosaе*, и белых гнилостных грибов), Инокуль С (смесь Инокуля А и Инокуля В) (Xi et al., 2005). Исследованы такие параметры, как температура, эмиссия кислорода, углекислоты, сероводорода, и микробная концентрация. Максимальная скорость поглощения кислорода в контроле, опытах А, В и С составила 0.22, 0.32, 0.28 и 0.34 моль/ч кг, соответственно. Общее количество накопленного кислорода составило 511.18, 684.57, 659.74 и 778.47 г/час кг, соответственно. К тому же, выделение пахнущих газов было значительно снижено посредством инокуляции. Для понимания механизмов процесса инокуляционного компостирования разработаны две стадии кинетического уравнения с точки зрения микробной кинетики. Эти уравнения показывают, что на первой стадии микробная концентрация была основным лимитирующим фактором темпов деградации. Темпы деградации в контроле, опытах А, В и С составили 10.5, 13.61, 13.08 и 15.671 г/час кг, соответственно. На второй стадии, в основном влияла субстратная концентрация. Хотя темпы деградации были схожи для обоих вариантов (с инокуляцией и без) инокуляция могла снизить коэффициент скорости K_m наполовину, и в свою очередь эффективно стабилизировать продукты компостирования. Следовательно, инокуляция могла улучшить эффективность процесса компостирования.

Компостирование бытовых отходов изучалось Иенгаром (Iyengar et al., 2005). Процесс компостирования изучен с использованием различных типов реакторов, каждый воспроизводил разные условия для формирования компоста. Один из них был создан как динамичный цельно-смесевой тип реактора для бытового компоста. Для инокулирования раствора коровьего навоза использованы культуры, ускоряющие компостирование (*Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichorus spirallis*, *Aspergillus* sp., *Paecilomyces fisisporus*, *Chaetomium globosum*). Затем использовали мульчу/компост, сформированный в соответствующих инокулюму реакторах. Реакторы загрузили сырьем так же, как обрабатывали растительные отходы: на 4 недели, и затем сформированная мульча была допущена к созреванию. Мульча проанализирована на разных этапах компостирования по разным параметрам.

Компост из разработанного аэробного реактора обеспечивал хороший перегной для удобрения бедной почвы. Использование этого метода компостирования является эффективным, экологически безопасным, экономически выгодным решением использования бытовых твердых отходов.

Применение *Trichoderma* для разложения неприродных соединений

Во многих работах было показано что, грибы рода *Trichoderma* могут быть весьма устойчивы к промышленным загрязнениям окружающей среды. Так, например, при сравнении микобиоты загрязненных и экологически чистых местообитаний в Марокко выяснилось, что *T. koningii* встречается только в наиболее неблагоприятных местах. С другой стороны, есть указания на то, что некоторые виды этого рода весьма чувствительны к определенным типам загрязнения. Например, *T. viride* чувствительна к загрязнению почв хвойного леса угольной пылью, а *T. harzianum* и *T. longipilus* были чувствительны к присутствию гербицида фосфинотрицина. Показано снижение

встречаемости *T. hamatum* в органогенном горизонте фоновых альфегумусовых подзолах (Марфенина, 2005).

Показано, что штаммы *Trichoderma* способны утилизировать цианиды в качестве источника углерода. При использовании глюкозы в качестве кометаболита эффективность деградации цианидов возрастала в три раза, и происходило пропорциональное увеличение биомассы грибов (Ezzi, Lynch, 2005).

Цианиды – общие загрязняющие примеси черноземных участков, особенно территории старых газовых заводов. Они также представлены на золотых приисках. В 2000 г. цианидный мусор распространился из Австрийских приисков в Румынию, более 80% рыбы было убито в реке Tizsa, которая течет через Югославию и Венгрию. Более беспокоило, что вода, поставленная для более 2,5 миллионов людей, угрожала выделением 378,500 л цианидсодержащих веществ из резервуара как Aural Gold Mine at Baia Mare. Авторы показали, что даже природно сформированный цианид в низких концентрациях в ризосфере – около 10 мМ, очень фитотоксичен. Эти концентрации свободного цианида могут быть быстро катаболизированы с помощью видов *Trichoderma* в ризосфере почвы через действие формамид-гидролазы и родатазы. Цианиды почвы приводят к фитозагрязнению и даже отравлению человека.

Показана способность грибов к трансформации и устойчивости к ТНТ (*Cladosporium resinae*, *Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*). Все грибы выделяли метаболиты, такие, как азоксинитротолуол, аминодинитротолуол, гидроксилламинодинитротолуол. *Cladosporium resinae* и *Trichoderma viride* были наиболее устойчивы к ТНТ, что определялось по ингибированию зоны роста (Bauman et al., 1997).

Показана способность изолята *T. harzianum* разлагать пирен, что делает его идеальным кандидатом для эффективной биоремедиации полициклических ароматических углеводородов. При внесении *T. harzianum* в нефтезагрязненную почву этот вид становится доминантным, даже при высоком содержании нефти (15%) в почве (Терехова и др., 2006).

Показана способность видов рода *Trichoderma* разлагать различные химические вещества, загрязняющие окружающую среду. Грибы рода *Trichoderma* участвуют в деградации химических препаратов, используемых в сельском хозяйстве. Так, например, они способны разлагать многие хлорорганические пестициды, ДДТ, диелдрин, эндосульфат, пентахлорофенол и пентахлоронитробензин, но не могут разрушать гексахлороциклопексан. *Trichoderma harzianum*, наряду с некоторыми другими почвенными грибами, способна эффективно разрушать фосфорорганические гербициды цилиатин, глифосат и также аминоксифенил метилфосфиновую кислоту. *Trichoderma viride* входит в состав смеси грибов, разрушающих инсектицид хлорперифос. Показано, что *T. viride* трансформирует антибактериальные флуороквинолоновые препараты ципрофлоксацин и норфлоксацин (Parshikov et al., 2002).

Было показано, что *T. harzianum* и *T. viride* способны разлагать хлорорганические ксенобиотики как *in vitro*, так и в естественной среде, и исследована их роль в этом процессе в различных лесных почвах в Нью-Гемпшире. Доля участия разных видов (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. polysporum*) в этих процессах не одинакова. Обилие и видовой состав этих грибов может оказывать влияние на пространственное распределение загрязнения северных лесных почв хлорорганическими веществами. Места газоразработок сильно заражаются солями цианистой кислоты. В связи с этим, было показано, что культуры *Fusarium solani* и *T. polysporum*, изолированные из почвы около газоразработок, обладают способностью использовать железные или никелевые соли цианистой кислоты как единственный источник азота в кислой или нейтральной среде.

Австралийские ученые показали, что *T. harzianum*, присутствующая в воде озера, загрязненного хлорфенольными отходами целлюлозно-бумажного комбината,

способна разлагать эти соединения, причем штаммы, выделенные ближе к комбинату, делают это эффективнее и способны выдерживать большие концентрации химикатов. Однако вызывает сомнение, действительно ли данный вид находится в воде озера в активном состоянии, а не в виде покоящихся структур, и играет важную роль в биоочистке загрязненной воды. Хофманн с соавторами показали окисление трифениларзина *T. harzianum* (Hofmann et al., 2001).

Грибы рода *Trichoderma* способствуют очищению почв не только разлагая сложные органические загрязнители, но и адсорбируя и накапливая ионы металлов, в том числе и токсичных. Так, например, аккумуляция цинка, кадмия и ртути голодающим и неголодающим мицелием *T. harzianum* происходит в широких пределах рН среды. Наибольшее количество накапливается в неголодающем мицелии при рН 6,5 (50 mmol kg⁻¹), однако при низких значениях рН накопление металлов может быть даже больше. *T. viride* способна накапливать кобальт в мицелии и конидиях. Причем не было замечено никакого влияния Со-60-излучения на прирост и морфологию колоний (Frank et al., 1993a, 1993b). *Rhizopus arrhizus* и *Trichoderma viride* способны адсорбировать из растворов двухвалентные катионы металлов Cu²⁺, Cd²⁺ и Zn²⁺. Накопление металлов зависело от уровня кислотности среды и наиболее эффективно в слабокислой среде (рН 6,5 для Cd²⁺ и Zn²⁺ и в рН 5 для Cu²⁺). *Trichoderma sp.* способна накапливать никель. Марфениной показано увеличение подвижности меди, никеля и цинка в результате жизнедеятельности *T. viride* (Марфенина, 2005).

Влияние грибов на распределение металлов в почве может быть весьма значительным, особенно при закислении почв в результате деятельности человека.

Кроме этого, грибы рода *Trichoderma* могут использоваться для переработки отходов, содержащих целлюлозу, лигнин, хитин, а также некоторые синтетические полимеры. Так, например, показано, что *Trichoderma* способна расти на целлофановой пленке, что может быть использовано для переработки отходов.

Разрабатываются биотехнологические методы для утилизации радиоактивных отходов, содержащих целлюлозу (хлопковая ткань, уплотнение). При этом радионуклиды адсорбируются биомассой микроорганизма. Наиболее эффективным был один *T. reesei*, для которого коэффициент удаления Со-60 достигал 54%.

Нами также обнаружены и выделены изоляты *Trichoderma* из нефтезагрязненных почв и нефтешламов. Показана возможность биоремедиации антропогенных ландшафтов с помощью интродукции изолятов *Trichoderma* с высокой активностью экзогидролаз (Алимова и др., 2006).

4.7.2. Применение *Trichoderma* в сельском хозяйстве РТ

4.7.2.1. Переработка отходов для получения биофунгицидов и биокомпоста с помощью *Trichoderma*

А. Осадки сточных вод характеризуются высоким содержанием органических элементов, что делает их привлекательными для использования в качестве мелиоранта нарушенных почв или органоминеральных удобрений в сельском хозяйстве, садоводстве, лесоводстве, в качестве грунта при зеленом строительстве и т.д. Но их внесение вызывает увеличение общего инфекционного фона почвы за счет повышения содержания органического вещества – увеличивается количество не только полезной микрофлоры, но и фитопатогенов (Cotxarrera et al., 2004). Следовательно, параллельно необходимо разрабатывать методы защиты растений от возбудителей заболеваний.

Использование *Trichoderma* совместно с различными отходами как биоудобрение и биопестицид решало бы проблему утилизации городских отходов производств и давало бы возможность получать на его основе экологически чистую пищевую продукцию и защищать от заболеваний декоративные культуры, газоны и сеянцы хвойных, используемых для озеленения города (фото 1, Приложение). Мы использовали штаммы *Trichoderma*, выделенные на территории РТ.

Определение антагонистической активности

Нами было исследовано влияние биопрепарата на количество жизнеспособных пропагул *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Bipolaris*. Изучение антагонистической активности выделенных изолятов проводилось в опытах *in vivo* на сеянцах сосны, на рассаде гвоздики и *in vitro* на семенах пшеницы, ржи, ячменя (рис.4.13, 4.14, 4.15).

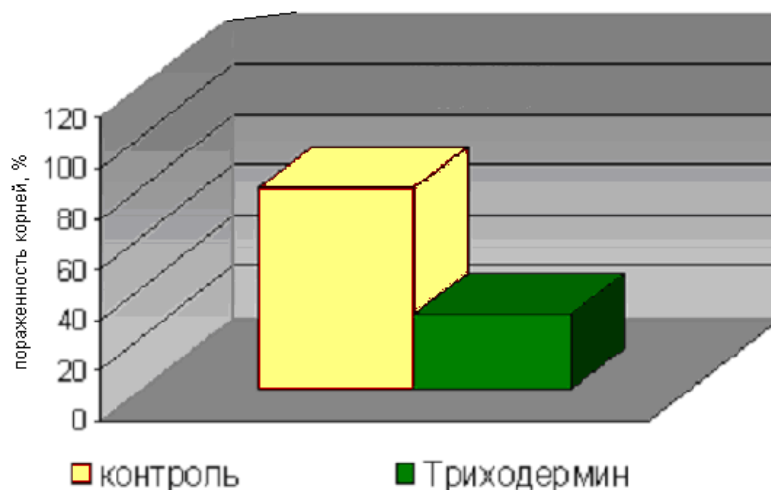


Рис. 4.13. Снижение пораженности фузариозом корней рассады гвоздики (%).

В результате эксперимента можно отметить снижение пораженности:

- *Fusarium* рассады гвоздики на 60%, семян огурца на 10%;
- *Alternaria* семян огурца на 40%; *Penicillium* и *Bipolaris* на 20%.

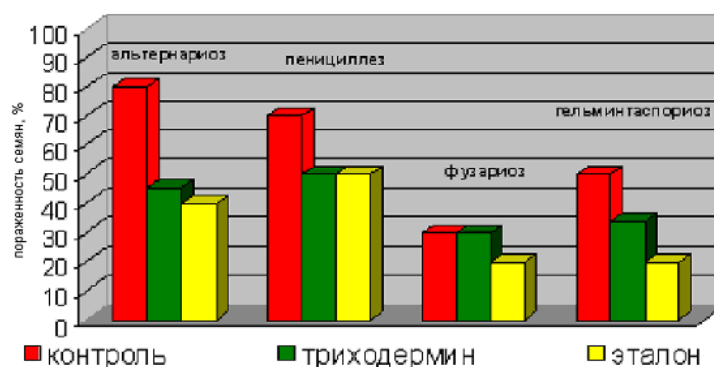


Рис. 4.14. Снижение пораженности семян огурца после обработки триходермином.

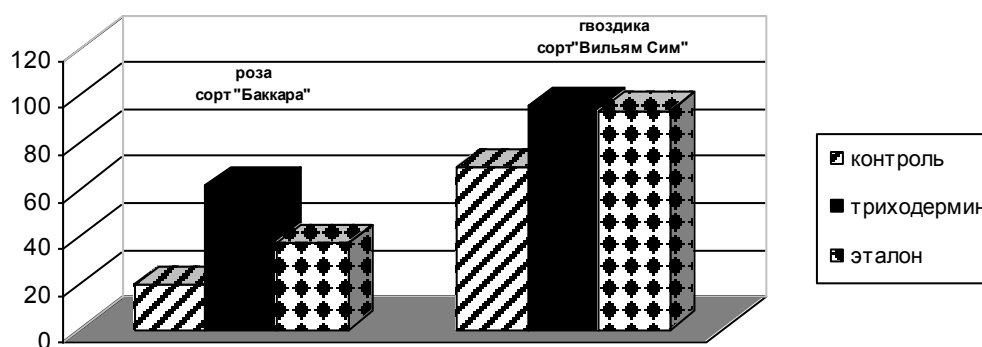


Рис. 4.15. Влияние культуральной жидкости *Trichoderma* на укореняемость черенков гвоздики и розы.

Изучение фитотоксических свойств

Одним из важных показателей качества биопрепарата является его взаимоотношение с возделываемым растением, то есть степень фитотоксичности интродуцента. Изучение взаимоотношений *Trichoderma* с тест-объектом проводили в опытах *in vitro*. Исходная культуральная жидкость всех исследуемых штаммов подавляла жизнедеятельность растения. Однако при разбавлении фитотоксичность уменьшалась, и проявлялись ростостимулирующие свойства КЖ *Trichoderma*. Наибольший уровень фитотоксического воздействия на растения был обнаружен для штаммов Т.8 и Т.23 и составил для исходной культуральной жидкости 88% и 95%, соответственно. При разбавлении КЖ микромицетов Т.8 и Т.23 фитотоксичность снижалась до 33% и 53%, соответственно. Для штамма Т.18 фитотоксичность исходной культуральной жидкости составила 30%, а по мере ее разбавления (1:100) отмечены ростостимулирующие свойства (38%). Наибольшую антагонистическую активность показали штаммы Т.20 и Т.23.

Влияние осадков сточных вод и биопестицида на жизнеспособность семян сосны *Pinus silvestris*

Для восстановления лесов только в питомниках Среднего Поволжья выращивается около 0,5 млрд. семян в год. Однако до недавнего времени почти пятая часть всходов и семян ежегодно погибала от болезней. Низкая результативность защиты семян обуславливается и недостаточностью изученности биологических особенностей некоторых болезней. В результате многократных фитопатологических обследований установлены основные причины ухудшения питомнического хозяйства: заметное снижение уровня агротехники выращивания семян, ухудшение физических свойств почв, несбалансированное внесение минеральных удобрений, неразумное применение гербицидов, нарушение биологических процессов в почве, широкое распространение в посевах болезней.

Из посеянных 150 растений в контроле на 7-е сутки взошли 59 семян, число которых к концу опыта снизилось до 29 штук, таким образом, величина отпада составила 80%. Под влиянием органических удобрений величина отпада снизилась в 2-3 раза при весеннем внесении, а при осеннем – в 1,5-2 раза. Вероятно, это связано с возрастанием численности активных сапротрофных микроорганизмов, которые влияют на супрессивность почв (рис. 4.16), что соответствует литературным данным (Cotxarrera et al., 2002).

Положительный эффект отмечен при внесении *Trichoderma* без ОСВ и составил 72 выживших сеянца, что в 2,5 раза выше уровня контроля. Это позволяет говорить о высокой биологической эффективности биопестицида. Отсутствие биологической эффективности от применения *Trichoderma* указывает на возможное анабиотическое состояние *Trichoderma* при её интродукции на навозе, таким образом, навоз не является перспективным адсорбентом для *Trichoderma* в условиях серой лесной почвы.

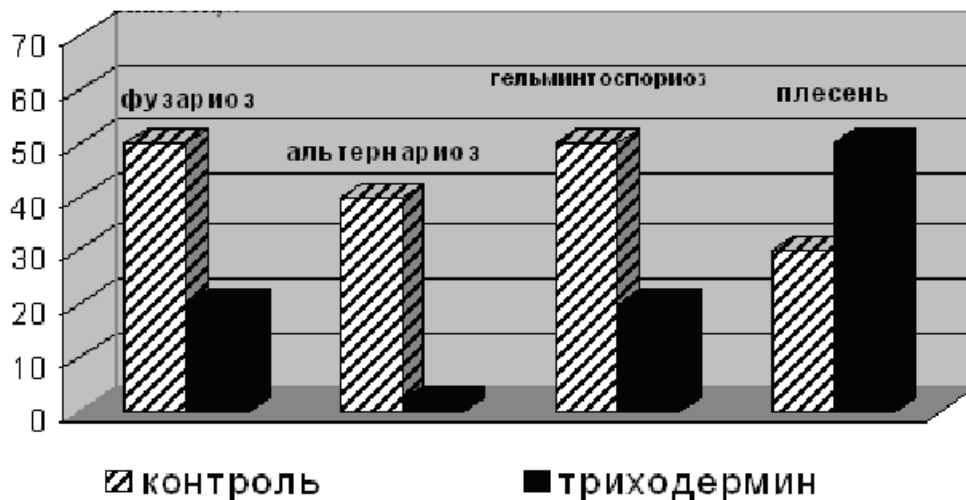


Рис. 4.16. Снижение инфекционного фона серой лесной почвы под сеянцами сосны (по оси ординат – пораженность, %).

Максимальный положительный эффект отмечен при комплексном внесении *Trichoderma*+ОСВ. Количество выживших растений составило 97 штук, что в 3,34 раза превышает контроль. Это объясняется тем, что данный адсорбент характеризуется высоким соотношением С/Н, а внесение же ОСВ, как известно, сопровождается эмиссией N-содержащих соединений в почву. Наибольший биологический эффект, вероятно, связан с синергическим эффектом воздействия адсорбентов, несущих споры *Trichoderma* и ОСВ. Таким образом, можно сказать, что интродукция *Trichoderma* более эффективна при использовании в качестве адсорбента компоста.

Данные о динамике численности всходов показывают, что внесение компоста и биопестицида увеличило количество взошедших сеянцев сосны по сравнению с контролем (рис. 4.17).

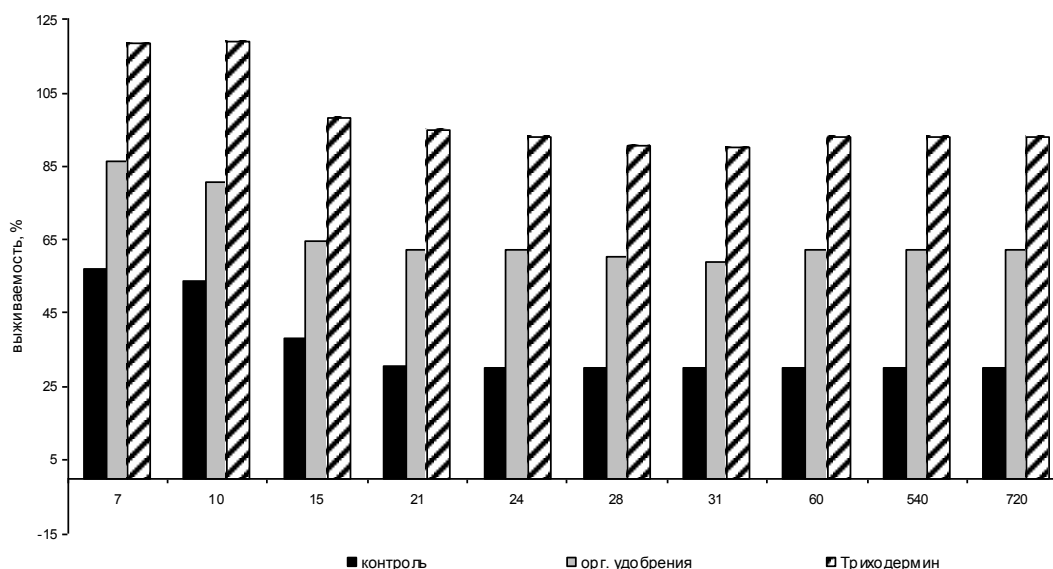


Рис. 4.17. Выживаемость сеянцев сосны в динамике (по оси ординат – количество сеянцев, шт.; по оси абсцисс – время, сут.).

Анализ кинетики конидий, адсорбированных на цеолите (рис.4.18), не выявил резких колебаний численности, но интродуцент оказался более жизнеспособным и сохранялся на высоком популяционном уровне ($18 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы), по сравнению с другими адсорбентами ($12 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы). Менее эффективным оказался широко используемый в РТ субстрат – шелуха (рис.4.19).

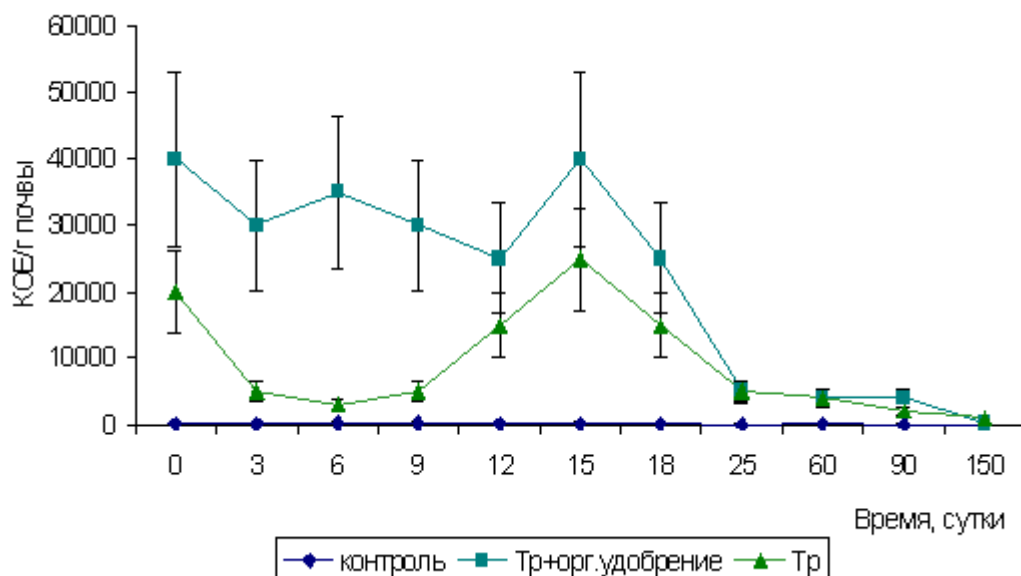


Рис. 4.18. Кинетика микромицета *Trichoderma*, адсорбированного на цеолите при интродукции в серую лесную почву.

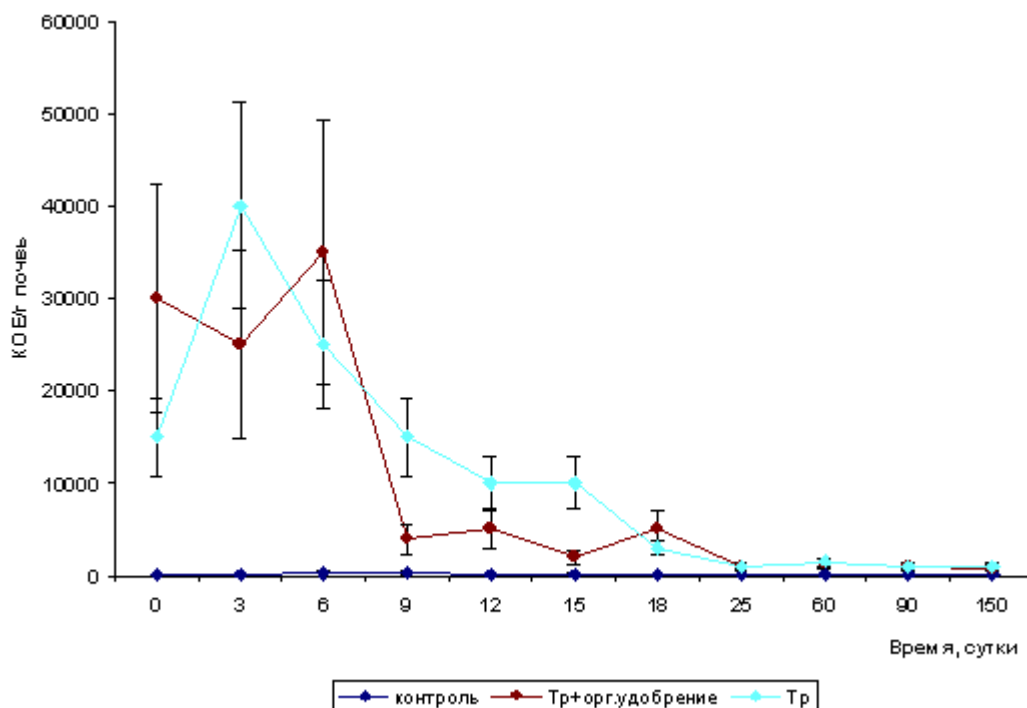


Рис. 4.19. Кинетика микромицета *Trichoderma*, адсорбированного на шелухе при интродукции в серую лесную почву.

Результаты наших экспериментов показали, что внесение в почву органических удобрений способствовало сохранению высокого количественного уровня популяции *Trichoderma*. Максимальное количество жизнеспособных спор в нашем эксперименте отмечено на 9 сутки для адсорбента опилки ($50 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы) и навоз ($30 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы), для шелухи – на 6 сутки ($35 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы) и для цеолита – на 15 сутки ($40 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы). Последующее постепенное снижение численности популяции является проявлением элиминации по принципу «хищник-жертва», когда почвенные простейшие могут регулировать численность микроорганизмов лишь при высокой численности последних. При низких уровнях популяционной плотности (для шелухи) гибель идет, вероятно, из-за конкуренции за питательный субстрат и вследствие других причин.

Таким образом, можно отметить активную жизнедеятельность адсорбированной формы конидий микромицета *Trichoderma harzianum* в серой лесной почве.

Б. Получение биопестицида на отходах пищевой промышленности.

Частью наших исследований был поиск оптимальной питательной среды на основе отходов пищевых предприятий Татарстана (пивного, сахарного заводов). Был испытан ряд сред, в состав которых входили концентрат барды, меласса, отработанные дрожжи.

Глубинное выращивание осуществлялось на ферментере Анкум-2М емкостью 5л при $t=28^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4-5$ с аэрацией и механической подачей пеногасителя Дикональ LQ-104.

Максимальный выход биомассы фитотрикса был получен на третьей сутки с меласно-дрожжевой среды, дрожжевой среды, концентрата барды и составил 6-12 г абсолютно сухой биомассы на 1л.

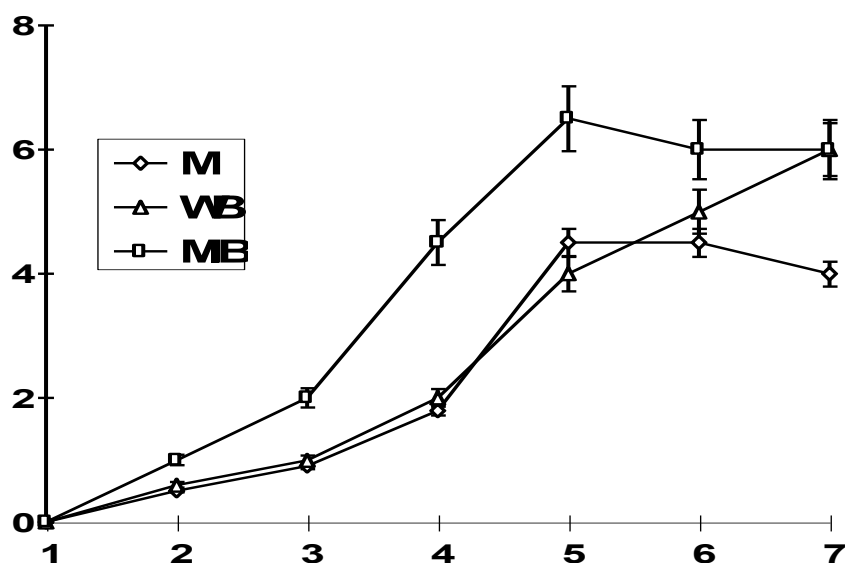


Рис. 4.20. Рост *Trichoderma* на различных отходах пищевой промышленности РТ. (М – меласса, МВ – меласно-дрожжевой бульон, WB – дрожжевой бульон).

Таким образом, интродукция фитотрикса в почву оказывает положительное влияние на азотфиксирующую активность, интенсивность дыхания и микробную биомассу почвы (фото 1, Приложение). Степень и тип воздействия определяется видом адсорбента, используемого для получения биопрепарата, и стадией сукцессии экологической ниши.

Показано, что *Trichoderma asperellum* (T.20) снижает пораженность возбудителями заболеваний декоративных культур (гвоздики и розы) на 30-60% и отпад семян хвойных культур на 30%. Исследования показали эффективность использования биопрепарата на основе и азотфиксирующих микроорганизмов (рис. 4.21).

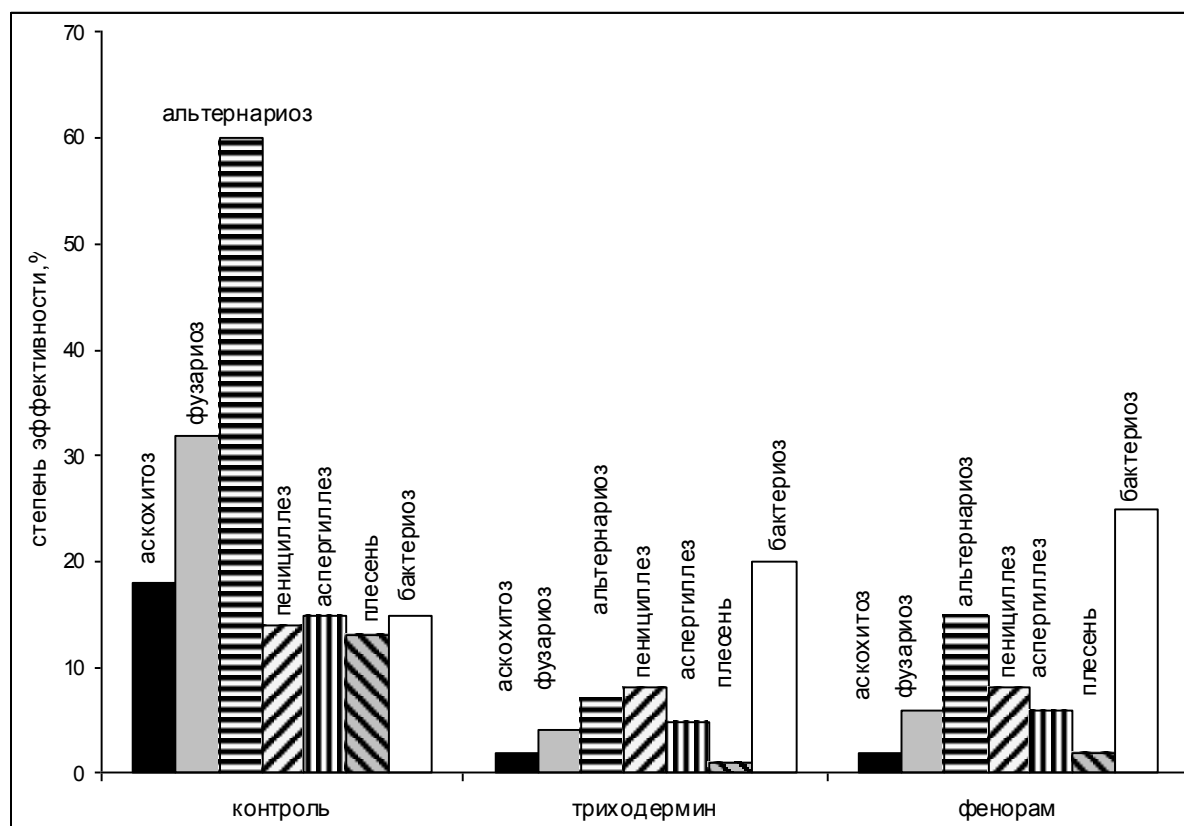


Рис 4.21. Эффективность действия биопрепарата на основе *T. asperellum* и *Rhizobium meliloti* на пораженность семян гороха.

Подобраны и испытаны новые виды *Trichoderma* для защиты овощных культур в тепличных хозяйствах. Эти виды могут быть использованы для производства биопестицидов с целью обеспечения городского населения экологически чистой пищевой продукцией (фото 2, 3, Приложение) и увеличения эффективности озеленения городских массивов (фото 1, Приложение).

Trichoderma harzianum (T.18) может быть использован для стимуляции роста и развития овощных и декоративных культур. Данный вид подходит для производства биопрепаратов-стимуляторов растений.

Отобраны виды *Trichoderma*, способные к утилизации промышленных, бытовых и пищевых отходов. Получены опытные партии компостов на основе отходов с использованием микроорганизмов рода *Trichoderma*, выделенные на территории РТ (фото 4, Приложение).

4.7.2.2. Производство корма для животных

Все большее применение в процессах переработки сельскохозяйственного сырья находит ферментативный гидролиз. Для создания кормовых рационов используют зерновые культуры. Ксиланы являются компонентами зерновых, активный гидролиз которых осуществляют ферменты, синтезируемые грибами и бактериями. В составе зерна всех злаков содержится довольно значительное количество пентозанов. Наибольшее их количество (до 11,4%) содержат фуражные сорта ржи. Именно это

обстоятельство не позволяет использовать ее в качестве основы кормовых рационов сельскохозяйственных животных, рожь применяется только в качестве их компонентов. Высокое содержание пентозанов вызывает повышение вязкости содержимого пищеварительного тракта животных, таким образом, делая зерна ржи трудноперевариваемыми. Несколько меньше пентозанов содержит пшеница (до 6,8%) и ячмень (до 7,2%). Таким образом, из состава зерна основных районированных в РТ злаковых культур можно сделать заключение о целесообразности исследования применения ксиланаз в составе кормовых рационов на основе злаков.

Нами проведены исследования влияния содержания ржи в кормовых рационах моногастричных, на их перевариваемость в модельных экспериментах *in vitro* (Dung, 2002). Как показали проведенные исследования, перевариваемость рационов резко снижается при содержании ржи более 20%. При увеличении доли ржи до 70% перевариваемость рационов уменьшается на 30%.

Для изучения возможности уменьшения антипитательного эффекта пентозанов в зерновых рационах, содержащих рожь, нами проведены эксперименты по изучению влияния добавок синтезированных грибных и бактериальных ксиланаз на перевариваемость кормов в модельных экспериментах *in vitro*. Как показали проведенные исследования, при применении ксиланаз, синтезированных бактериями *Bacillus*, в виде добавок к кормам, достоверного увеличения перевариваемости рационов, не отмечено. Ксиланазы грибов *Trichoderma*, при добавке в корма моногастричных животных, содержащие рожь, уменьшают антипитательный эффект пентозанов и увеличивают их перевариваемость (табл. 4.7).

Используя ступенчатую схему варки с применением препаратов ксиланаз *B. circulans*, амилосубтилин, глюкавоморин, удается добиться гидролиза 71% сырья. Применяя препараты *T. reesei* по этой схеме варки удается добиться гидролиза 54,4% сырья.

Таким образом, более предпочтительным для использования при гидролизе, исходя из его глубины, является использование схемы с применением препаратов *B. circulans*.

Т а б л и ц а 4.7

Моделирование перевариваемости *in vitro* рационов, содержащих 50% ржи с добавками ксиланаз *Trichoderma*, % ВСВ

Состав рациона	Содержание ксиланаз, IU/г							
	0	0.05	0.01	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
Рожь фуражная + Пшеница фуражная + <i>T/reesei</i>	53.4 +0.8	55.6 +0.7	57.0 +0.7	58.9 +0.7	59.7 +0.7	60.3 +0.7	60.5 +0.7	60.9 +0.8
Рожь фуражная + Пшеница фуражная + <i>T.18</i>	53.4 +0.8	55.8 +0.7	58.0 +0.7	59.3 +0.8	60.0 +0.7	60.1 +0.7	61.9 +0.8	62.0 +0.9
Рожь фуражная + Ячмень фуражный + <i>T/reesei</i>	50.5 +0.6	52.6 +0.6	53.5 +0.6	54.9 +0.6	55.1 +0.6	56.6 +0.6	56.8 +0.7	56.9 +0.9
Рожь фуражная + Ячмень фуражный + <i>T.18</i>	50.5 +0.6	53.7 +0.6	55.9 +0.6	56.39 +0.6	57.1 +0.5	58.1 +0.5	58.1 +0.8	58.0 +0.5
Состав рациона	Содержание ксиланаз, IU/г							

Нами проведены исследования моделирования перевариваемости *in vitro* кормовых рационов, содержавших рожь, подвергшихся предварительной ферментативной обработке. Результаты приведены в таблице 4.8, в сравнении с рационами без обработки. Результаты проведенных исследований показали, что с

84.0% при содержании 20% ржи в рационе до 74,9 при 30% ржи. При содержании ржи в рационе 40% переваримость продолжает значительно уменьшаться до 62.0%. При 70% содержания ржи переваримость снижается до 50%. При применении предварительной гидротермической обработке с применением препарата ксиланаз *B. circulans* значительного снижения переваримости не наблюдается вплоть до 60% содержания ржи в рационе. При содержании ржи в рационе 70% переваримость составляла 80%, что всего на 5% меньше переваримости рационов, содержавших 10-20% ржи и на 30% выше переваримости без предварительной гидротермической обработки.

Т а б л и ц а 4.8

Моделирование перевариваемости *in vitro* рационов, содержавших рожь, % ВСВ*

Состав рациона	Содержание ржи, % в рационе							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Рожь фуражная + Пшеница фуражная без обработки	85.0 +4.2	84.1 +4.6	84.0 +4.2	74.9 +4.6	62.0 +4.0	53.4 +4.8	52.5 +4.8	50.0 +4.8
Рожь фуражная + Пшеница фуражная с обработкой	85.0 +3.2	85.1 +4.6	85.2 +3.2	84.0 +3.6	82.0 +4.0	83.0 +3.8	82.0 +4.8	80.2 +3.8
Рожь фуражная + Ячмень фуражный без обработки	80.0 +4.9	79.1 +4.6	78.5 +4.2	66.9 +4.0	52.0 +4.0	50.5 +4.8	48.0 +4.7	48.0 +4.9
Рожь фуражная + Ячмень фуражный с обработкой	80.0 +4.9	79.2 +3.6	78.4 +3.2	76.9 +3.0	72.2 +4.0	70.2 +3.8	70.0 +4.7	70.3 +3.9

*(n=3) ($\alpha \leq 0.05$)

Предварительная обработка, с применением препаратов ксиланаз *B. circulans*, позволяет уменьшить антипитательный эффект пентозанов ржи и увеличить перевариваемость кормов, содержащих рожь. Из приведенных результатов видно, что при увеличении содержания ржи в смешанных рационах с пшеницей, до 30% перевариваемость рационов начинает резко снижаться.

Так же отмечено значительное увеличение перевариваемости рационов, содержавших ячмень и рожь. При 70% содержании в рационе ржи предварительная гидротермическая обработка с применением препаратов ксиланаз *B. circulans* позволяет увеличить их перевариваемость на 22%.

Полученные результаты проведенных исследований показали, что ксиланазная активность ферментных препаратов всех исследованных нами почвенных грибов *Trichoderma* имеет оптимум рН в районе 5.0-6.0, ксиланазная активность резко снижается при приближении к рН 4 и еще больше снижается при сдвиге рН в щелочном направлении. Ксиланазная активность ферментов исследованных нами штаммов рода *Bacillus* имеет оптимум рН в районе 8.0, и резко снижается при повышении кислотности среды. При сдвиге рН в щелочную сторону от оптимума до 9.0 не вызывает значительного снижения активности ксиланаз.

Переваривание животными корма – достаточно длительный процесс. Поэтому нами проведены исследования влияния 10-часовой инкубации при температуре 37°C на ксиланазы, синтезированные почвенными штаммами *T.2*, *14*, *18*, *T. reesei* и бактериями *B. cereus*, *B. circulans*, *B. intermedius*.

Исследование ксиланаз *Trichoderma* в течение 10 часов при рН 2 показало потерю активности всех исследованных препаратов около 80%. Лучшие свойства по

сохранению активности проявили ксиланазы штамма *T. reesei*. Причем снижение активности происходит практически пропорционально времени. В целом, такие параметры устойчивости говорят о возможности применения, полученных препаратов в рационах сельскохозяйственных животных.

Исследование ксиланаз *Bacillus* в физиологических условиях желудка показало потерю активности всех исследованных препаратов около 95%. Причем в первые 5 часов ксиланазная активность препаратов теряет 60% исходной активности. Результаты продемонстрировали превосходство стабильности грибных ксиланаз в сильноокислой среде желудочно-кишечного тракта животных, в сравнении с бактериальными ксиланазами.

При высоких температурах и рН, близких к нейтральному, наоборот более высокую стойкость проявили бактериальные ксиланазы.

При инкубировании препаратов *Trichoderma* при 65°C наблюдается резкое снижение активности после минутной выдержки, а через 2 минуты препараты теряют 80% активности. А при проведении процесса при 70°C аналогичная потеря активности наблюдается уже через 1 минуту после начала инкубации.

При 65°C препараты, синтезированные штаммами *B. cereus*, *B. circulans*, сохранили в течение 2 минут 85-95% активности. При проведении процесса при 70°C за 90 секунд инкубации ксиланазы, синтезированные штаммами *B. cereus*, *B. circulans* сохранили 75-90% активности. Такая повышенная термостойкость ксиланаз *B. cereus*, *B. circulans* делает перспективным их применение в процессах предварительной обработки зерновых рационов, содержащих рожь, предусматривающих тепловую обработку.

Исходя из исследованных свойств, полученных грибных и бактериальных препаратов ксиланаз, нами принято решение исследовать, влияние на перевариваемость рационов моногастричных, содержащих рожь, добавок препаратов *T. reesei*, проявивших большую устойчивость при рН=2. В этих исследованиях установлено повышение перевариваемости в модельных экспериментах *in vitro* зерновых кормовых компонентов рационов, содержащих 50% ржи, на 4,5-5,2% по сравнению с контролем без ксиланаз. В исследованиях определены оптимальные нормы ввода ксиланаз. Выявлено, что для кормовых рационов из зерновых смесей, содержащих 50% ржи оптимальная дозировка ксиланаз- 0,20-0,25 IU/г.

Нами проведены исследования применения термостойких препаратов ксиланаз, полученных при культивировании *B. circulans* при предварительной тепловой обработке зерновых рационов, содержащих рожь. Результаты проведенных исследований показали, что внесение ксиланаз *B. circulans* при гидротермической обработке обеспечивает повышение на 22-30% гидролизуемости содержащих рожь зерносмесей.

Литература

1. Abd El-Rahim W.M. Microflora involved in textile dye waste removal / W.M. Abd El-Rahim, H. Moawad, M. Khalafallah // *J. Basic Microbiol.* – 2003. – Vol. 43. – № 3. – P. 167-174.
2. Agosin E. Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses / E. Agosin, J.M. Aguilera // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application.* – London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 205-227.
3. Ahmed A.S. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation / A.S. Ahmed, C.P. Sanchez, M.E. Candela // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2000. – Vol. 106. – P. 817-824.
4. Ahmed S. Molecular Cloning of Cellulase Genes from *Trichoderma harzianum* / S. Ahmed, N. Aslam, F. Latif, M.I. Rajoka, A. Jamil // *Frontiers in Natural Product Chemistry.* – 2005. – Vol. 1. – № 1, January. – P. 73-75.
5. Ait-Lahsen H. An antifungal Exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* / H. Ait-Lahsen, A. Soler, M. Rey, J. De La Cruz, E. Monte, A. Llobell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – P. 5833-5869.
6. Altomare C. Solubilisation of Phosphates and Micronutrients by the Plant – Growth – Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 / C. Altomare, W.A. Norvell, T. Bgorkman, G.E. Harman // *Appl. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – №7. – P. 2926-2933.
7. Antal Z. Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species / Z. Antal, L. Manczinger, G. Szakacs, R.P. Tengerdy, L. Ferency // *Mycol. Res.* – 2000. – Vol. 104. – P. 545-549.
8. Antal Z. Complete DNA Sequence and analysis of a mitochondrial plasmid in the mycoparasitic strain *Trichoderma harzianum* T95 / Z. Antal, L. Manczinger, L. Kredics, F. Kevei, E. Nagy // *Plasmid.* – 2002. – Vol. 47. – P. 148-152.
9. Arora D.K. Handbook of applied mycology / D.K. Arora, R.P. Elander, K.G. Mukerji. *Fungal Biotechnology*, vol 4. New York: Marcel Dekker, 1992.
10. Arst J.H.N. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems / J.H.N. Arst, M.A. Peñalva // *Trends Genet.* – 2003. – № 19. – P. 224-231.
11. Audic S. Claverie J.M. The significance of digital gene expression profiles / S. Audic, J.M. Claverie // *Genome Res.* – 1997. – Vol. 10. – P. 986-995.
12. Bailey B.A. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens / B.A. Bailey, R.D. Lumsden // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application.* London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 185-204.
13. Baker E.N. Crystals of family 11 xylanase II from *Trichoderma longibrachiatum* that diffract to atomic resolution / E.N. Baker, Z. Dauter // *Acta Cryst.* – 2004. – Vol. D60. – P. 1275-1277.
14. Barak R. Determination by fluorescein diacetate staining of fungal viability during mycoparasitism / R. Barak, I. Chet // *Soil Biol. Biochem.* – 1986. – Vol. 18. – P. 315 – 319.
15. Barak R. Lectins of *Sclerotium rolfsii*: its purification and possible function in fungal-fungal interaction / R. Barak, I. Chet // *Appl. Bacteriol.* – 1990. – Vol. 69. – P. 101 – 112.
16. Belandger R.R. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential

- role of antibiosis and parasitism / R.R. Belandger, N. Dufour, J. Caron, N. Benhamou // *Biocontrol Sci. Technol.* – 1995. – Vol. 5. – P. 41-53.
17. Benítez T. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains / T. Benítez, AM. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón // *International Microbiology.* – 2004. – № 7. – P. 249-260.
 18. Benítez T. Glucanolytic and other enzymes and their genes / T. Benítez, C. Limón, J. Delgado-Jarana, M. Rey // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. – London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 101-127.
 19. Biely P. Enzymology of hemicellulose degradation / P. Biely, M. Tenkanen // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 25-47.
 20. Blaiseau P.L. Primary structure of a chitinase-encoding gene (*chi1*) from the filamentous fungus *Aphanocladium album*: similarity to bacterial chitinases / P.L. Blaiseau, Lafai J.F. // *Gene.* – 1992. – Vol. 120. – P. 243-248.
 21. Blumenthal C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi // *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* – 2004. – № 39. – P. 214-228.
 22. Bolar J.P. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduced vigor / J.P. Bolar, J.L. Norelli, K.-W. Wong, C.K. Hayes, G.E. Harman, H.S. Aldwinckle // *Phytopathology.* – 2000. – V. 90. – P. 72-77.
 23. Brunner K. A G protein alpha subunit negative mutant of *Trichoderma atroviride* shows enhanced growth inhibition of plant pathogens and upregulation of a peptaibol synthetase / K. Brunner, B. Rethner, R.L. Mach, N. Stoppacher, R. Schuhmacher, S. Zeilinger // 9th International Workshop on *Trichoderma and Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
 24. Buchert J. Application of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry / J. Buchert, T. Oksanen, J. Pere, M. Siika-aho, A. Suurnäkki, L. Viikari // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 343-363.
 25. Carsolio C. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism / C. Carsolio, N. Benhamou, S. Haran, C. Cortes, A. Gutierrez, I. Chet, A. Herrera-Estrella // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 929-935.
 26. Castle A. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms / A. Castle, D. Speranzini, N. Rghei, G. Aim, D. Rinker // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – № 1. – P. 133-137.
 27. Chambergo F. S., Bonaccorsi E. D., Ferreira A. J., Ramos A. S., Ferreira J. R., Júnior J. R., Abrahão-Neto J., Farah J. P., El-Dorry H. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using EST analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem.* – 2002. – № 277(16). – P. 13983-13984.
 28. Chellappan M., Dunn-Coleman N., Hillian A., Houfek T., Mitchell T., Solingen P. V., Teunnissen P. D., Wang D., Ward M., Yao J., Dean R. A. Durable resources for discovery and development of new gene products from *Trichoderma reesei*. Phase I cDNA and BAC end sequencing. XXI Fungal Genetics Conference Asilomar, California. – 2001.
 29. Chen X. PCR-based genotyping of epidemic and pre-epidemic *Trichoderma* isolates associated with green mold of *Agaricus bisporus* / X. Chen, C.P. Romaine, Q. Tan, B. Schlaghauser, M.D. Ospina-Giraldo, D.J. Royse, D.R. Huff // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 2674-2678.
 30. Chet I. *Biotechnology in Plant Disease Control.* New York: Wiley-Liss, 1993.

– 373 p.

31. Chet I. Mycoparasitism and lytic enzymes / I. Chet, N. Benhamou, S. Haran // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 153-171.

32. Chinshuh C. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production / C. Chinshuh, J. Chen, T. Lin // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1997. – V. 21. – Issue 2. – P. 91-96.

33. Ciliento R. Genetic improvement of *Trichoderma harzianum* strain T22 using an inducible promoter and the *Aspergillus niger* *goxA* gene / R. Ciliento, S.L. Woo, K. Brunner, R. Marra, S. Ferraioli, P. Ambrosino, I. Soriente, M. Ruocco, D. Turra, S. Lanzuize, S. Gigante, R.L. Mach, S. Zeilinger, M. Lorito // 9th International Workshop on *Trichoderma and Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

34. Cobos A. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414 / A. Cobos, P. Estrada // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2003. – V. 33. – P. 810-818.

35. Colina A. Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw / A. Colina, B. Sulbarán-De-Ferrer, C. Aiello, A. Ferrer // *Appl. Biochem. and Biotechnol.* – 2003. – V. 108. – Issue 1-3. – P. 715-724.

36. Cotxarrera L. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato / L. Cotxarrera, M.I. Trillas-Gay, C. Steinberg, C. Alabouvette // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2002. – № 34. – P. 467-476.

37. Dana M.M. Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum* / M.M. Dana, M.C. Limón, R. Mejías, R.L. Mach, T. Benítez, J.A. Pintor-Toro, C.P. Kubicek // *Curr. Genet.* – 2001. – Vol. 38. – P. 335-342.

38. Darmono T.W. Large scale application of growth promoting *Trichoderma* with biofungicidal activity / T.W. Darmono, A. Purwantara // 9th International Workshop on *Trichoderma and Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

39. De la Cruz J. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum* / J. De la Cruz, A. Hidalgo-Gallego, J.M. Lora, T. Benítez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobell // *European J. of Biochem.* – 1992. – Vol. 206. – P. 859-867.

40. Delgado-Jarana J. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of *gtt1* / J. Delgado-Jarana, M.A. Moreno-Mateos, T. Benítez // *Euk Cell*. – 2003. – № 2. – P. 708-717.

41. Dienera S.E. Insight into *Trichoderma reesei*'s genome content, organization and evolution revealed through BAC library characterization / S.E. Dienera, M.K. Chellappana, T.K. Mitchell, N. Dunn-Coleman, M. Ward, R.A. Deana // *Fungal Genetics and Biology*. – 2004. – Vol. 41. – P. 1077-1087.

42. Djonovic S. Functional Characterization of β -1,6-glucanase from *Trichoderma virens* and enhanced antifungal activity of transformants constitutively co-repressing β -1,6-glucanase and β -1,3-glucanase / S. Djonovic, A. Mendoza-Herrera, C.M. Kenerly // 9th International Workshop on *Trichoderma and Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006a.

43. Djonovic S. Sm1, a proteinaceous elicitor by *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance / S. Djonovic, M.J. Pozo, L.J. Dangott, C.R. Howell, C.M. Kenerly // 9th International Workshop on *Trichoderma and Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006b.

44. Donzelli B.G.G. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and β -1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1 / B.G.G. Donzelli, K.J. Siebert, G.E. Harman // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2005. – № 37. – P. 82-92.

45. Druzhinina I. *Hypocrea flaviconidia*, a new species from Costa Rica with yellow conidia / I. Druzhinina, P. Chaverri, P. Fallah, C.P. Kubicek, G.J. Samuels // *Studies in Mycology*. – 2004. – Vol. 50. – P. 401-407.

46. Druzhinina I.S. An unknown species of Hypocreaceae isolated from lung tissue of a patient with pulmonary fibrosis / I.S. Druzhinina, K. LaFe, M. Komon-Zelazowska, J.D. Rogers, C.P. Kubicek // 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. – 2006.
47. Dung N.N.X. Estimation of neutral detergent fibre degradation in pigs by an in vitro method / N.N.X. Dung, P. Ude // Animal feed science and technology. – 2002. – Vol. 95. – P. 205-214.
48. Elad Y. Parasitism of Trichoderma spp. on Rhizoctonia solani and Sclerotium rothsii – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy // Y. Elad, I. Chet, Y. Henis // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73. – P. 85-88.
49. Ezzi M.I. Biodegradation of cyanide by Trichoderma spp. and Fusarium spp. / M.I. Ezzi, J.M. Lynch // Enzyme and Microbial Technology. – 2005. – Vol. 36. – P. 849–854.
50. Foreman P. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus Trichoderma reesei / P. Foreman, D. Brown, L. Dankmeyer, R. Dean, S. Diener, N. Dunn-Coleman, F. Goedegebuur, T. Houfek, G. England, A. Kelley, H. Meerman, T. Mitchell, C. Mitchinson, H. Olivares, P. Teunissen, J. Yao, M. Ward // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 31988-31997.
51. Franco P.F. Production and characterization of hemicellulase activities from Trichoderma harzianum Strain T4 / P.F. Franco, H.M. Ferreira, E.X. Filho // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2004. Feb 6 [Epub ahead of print].
52. Galante Y.M. Application of Trichoderma enzymes in the food and feed industry / Y.M. Galante, A. De Conti, R. Monteverdi // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). Trichoderma and Gliocladium, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 327-342.
53. Garcia I. Cloning and characterization of a chitinase (chit42) cDNA from the mycoparasitic fungus Trichoderma harzianum / I. Garcia, J.M. Lora, J. de la Cruz, T. Benitez, A. Llobell, J.A. Pintor-Toro // Current Genetics. – 1994. – Vol. 27. – P. 83-89.
54. Giese E.C. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by Botryosphaeria rhodina and Trichoderma harzianum Rifai / E.C. Giese, L.G. Covizzi, D. Borsato, R.F.H. Dekkera, M.L.C. Silva, A.M. Barbosa // Process Biochemistry. – 2005.
55. Gomez I. Genetic diversity and vegetative compatibility among Trichoderma harzianum isolates / I. Gomez, I. Chet, A. Herreraestrela // Molecular and General Genetics. – 1997. – Vol. 256. – P. 127-135.
56. Gusakov A. A comparative study of different cellulase preparations in the enzymatic treatments of cotton fabrics / A. Gusakov, A. Berlin, N. Popova, O. Okunev, O. Si-nitsyna, A. Sinitsyn // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2000. – Vol. 88. – P. 119-126.
57. Gutierrez S. Biocontrol applications: keynote on antimicrobial activities. The case of terpene biosynthesis / S. Gutierrez, R.E. Cardoza, J.A. Vizcaíno, M.R. Hermosa, E. Monte // 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. – 2006.
58. Haapala R. Production of endo-1,4- α -glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free Trichoderma reesei / R. Haapala, E. Parkkinen, P. Suominen, S. Linko // Enzyme and Microbial Technology. – 1996. – Vol. 18. – P.495-501.
59. Halt M. Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants // Eur. J. Epidemiol. – 1998. – Vol. 14. – P. 269-274.
60. Harman G.E. Plant genomic environmental factors that affect the abilities of Trichoderma spp. to induce plant resistance and increased growth / G.E. Harman, D. Custis, M. Shores // 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. – 2006.
61. Harman G.E. Combination of fungul cell degrading enzyme and fungul cell membrane affecting compound / G.E. Harman, M. Lorito, A. Di Pietro, C.K. Hayes, F. Scala,

C.P. Kubicek // US Patent 6,512,166, issued Jan.28, 2003.

62. Harman G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22 // *Plant Dis.* – 2000. – Vol. 84. – P. 377-393.

63. Harman G.E. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement / G.E. Harman, T. Björkman // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 229-265.

64. Harman G.E. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts / G.E. Harman, C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito // *Nature Reviews.* – 2004. – Vol. 2. – P. 43-56.

65. Hayashia N. Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I crystalline domains / N. Hayashia, T. Kondob, M. Ishihara // *Carbohydrate Polymers.* – 2005. – Vol. 61. – P. 191-197.

66. Henrissat B. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolase / B. Henrissat, A. Bairoch // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 316. – P. 695-696.

67. Héraux F.M.G. Combining *Trichoderma virens*-inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables / F.M.G. Héraux, S.G. Hallett, S.C. Weller // *Biological Control.* – 2005. – Vol. 34. – P. 21-26.

68. Hermosa M. R., Grondona I., Iturriaga E. A., Diaz-Minguez J. M., Castro C., Monte E., Garcia-Acha I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. // *Appl Environ Microbiol.* – 2000. – № 66. – P.1890-1898.

69. Hernandez-Onate M. Induction of conidiation by mycelial injury in *Trichoderma reesei* / M. Hernandez-Onate, A. Herrera-Estrella // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

70. Hildén L. Surface character of pulp fibres studied using endoglucanases / L. Hildén, P. Våljamäe, G. Johansson // *Journal of Biotechnology.* – 2005. – Vol. 118. – P. 386-397.

71. Hjeljord L.G. Effect of Germination Initiation on Competitive Capacity of *Trichoderma atroviride* P1 Conidia / L.G. Hjeljord, A. Tronsmo // *Phytopathology.* – 2003. – Vol. 93. – № 12. – P. 1593-1598.

72. Hofmann K. Oxidation of triphenylarsine to triphenylarsineoxide by *Trichoderma harzianum* and other fungi // K. Hofmann, E. Hammer, M. Kohler, V. Bruser // *Chemosphere.* – 2001. – Vol. 44. – P. 697-700.

73. Howell C.R. A study of the characteristics of «P» and «Q» strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases / C.R. Howell, L.S. Puckhaber // *Biological Control.* – 2005. – Vol. 33. – Issue 2. – P. 217-222.

74. Howell C.R. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens* / C.R. Howell, L.E. Hanson, R.D. Stipanovic, L.S. Puckhaber // *Phytopathology.* – 2000. – Vol. 90. – P. 248-251.

75. Howell C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts // *Plant. Dis.* – 2003. – Vol. 87. – P. 4-10.

76. Howell C.R. The role of antibiosis in biocontrol. Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd, 1998. – P. 173-184.

77. Iyengar S.R. In-vessel composting of household wastes / S.R. Iyengar, P.P. Bhavne // *Waste Management.* – 2005. in press.

78. Jänis J. Thermostability of endo-1,4- β -xylanase II from *Trichoderma reesei* studied by electrospray ionization Fourier-transform ion cyclotron resonance MS,

- hydrogen/deuterium-exchange reactions and dynamic light scattering / J. Jänis, J. Rouvinen, M. Leisola, O. Turunen, P. Vainiotalo // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 356. – P. 453-463.
79. Juhasz T. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources / T. Juhasz, Z. Szengyel, K. Reczey, M. Siika-Aho, L. Viikari // *Process Biochemistry.* – 2005. – № 40. – P. 3519–3525.
80. Kildesø J. Determination of fungal spore release from wet building materials / J. Kildesø, H. Würtz, K.F.P. Kruse, K. Wilkins, U. Thrane, S. Gravesen, P.A. Nielsen, T. Schneider // *Indoor Air.* – 2003. – № 13. – P. 148-155.
81. Koivula A. Structure-function relationships in *Trichoderma* cellulolytic enzymes A. Koivula, M.Linder and T.T.Teeri // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 3-23.
82. Kovacs K. Fermentation and hydrolysis experiments with new *Trichoderma* mutants in comparison with *Trichoderma reesei* Rut C30 / K. Kovacs, L. Megyeri, G. Szacs, M. Galbe, G. Zacchi // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
83. Kredics L. Taxonomical aspects of *Trichoderma* as a an opportunistic human pathogen / L. Kredics, Z. Antal, A. Szekeres, L. Hatvani, M. Komon, L. Manczinger, C. Vagvolgyi, E. Nagy, C.P. Kubicek, I.S. Druzhinina // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
84. Kredics L. *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential / L. Kredics, Z. Anta, L. Manczinger, A. Szekeres, F. Kevei, E. Nagy // *Food Technol. Biotechnol.* – 2003. – № 1. – Vol. 41. – P. 37–42.
85. Krishna S.H. Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414 / S.H. Krishna, K.C.S. Rao, J.S. Babu, D.S. Reddy // *Bioprocess Engineering.* – 2000. – № 22. – P. 467-470.
86. Kubicek C.P. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma* / C.P. Kubicek, M.E. Penttilä // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 49-72.
87. Kubicek C.P. *Trichoderma*: from genes to biocontrol / C.P. Kubicek, R.L. Mach, C.K. Peterbauer, M. Lorito // *J. of Plant Pathology.* – 2001. – Vol. 83. – № 2. – P. 11-23.
88. Kuhls K. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride* / K. Kuhls, E. Lieckfeldt, T. Borner, E. Gueho // *Medical Mycol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 25-33.
89. Kullnig C. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (=T. *harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact / C. Kullnig, R.L. Mach, M. Lorito, C.P. Kubicek // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 2232-2234.
90. Kullnig C.M., Krupica T., Woo S.L., Mach R.L., Rey M., Benitez T., Lorito M., Kubicek C.P. Confusion abounds over identity of *Trichoderma* biocontrol isolates // *Mycological Research.* – 2001.
91. Kullnig-Gradinger G.M., Szakacs G., Kubicek C. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma* a multisene approach.//*Mycol Res.* – 2002. – №106. – P.757-767.
92. Lees-Haley P.R. Toxic mold and mycotoxins in neurotoxicity cases: *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichothecenes* // *Psychol. Rep.* – 2003. – Vol. 93. – № 2. – P. 561-84.
93. León A. Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum ech42* gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology / A. León, H. Jimenez-Islas, M. Gonzales-Cuevas, A.P.B. de la Rosa // *Process Biochem.* – 2004. – Vol. 39. – P. 2173-2178.

94. Lieckfeldt E. Endochitinase gene based phylogenetic analysis of *Trichoderma* / E. Lieckfeldt, Y. Cavignac, C. Fekete, T. Börner // *Microbiol. Res.* – 2000. – Vol. 155. – P. 7-15.
95. Limón M.C. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding-domain / M.C. Limón, M.R. Chacón, R. Mejías, J. Delgado-Jarana, A.M. Rincón, A.C. Codón, T. Benítez // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – № 64. – P. 675-685.
96. Limón M.C. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa-chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* / M.C. Limón, J.M. Lora, I. Garcia, J. De la Cruz, A. Llobell, T. Benítez, J.A. Pintor- Toro // *Curr. Genet.* – 1995. – Vol. 28. – P. 478-483.
97. Liu Pi-g. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach / Pi-g. Liu, Q. Yang // *Res. Microbiol.* – 2005. – Vol. 156. – Issue 3. – P. 416-423.
98. Lora J.M. Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase gene from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* / J.M. Lora, J. De la Cruz, A. Llobell, T. Benítez, J.A. Pintor- Toro // *Mol. Gen. Genet.* – 1995. – Vol. 247. – P. 639-645.
99. Lorito M. Antifungal chitinolytic enzymes from *T. harzianum* and *G. virens*: purification, characterization, biological activity and molecular cloning / M. Lorito, C.K. Hayes, C.K. Peterbauer, A. Tronsmo, S. Klemsdal, G.E. Harman / RAA Muzzarelli ed. *Chitin enzymology*. Ancona: European Chitin Society, 1993. – P. 383-392.
100. Lorito M. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens / M. Lorito, S.L. Woo, I.G. Fernandez, G. Colucci, G.E. Harman, J.A. Pinter-Toro, E. Phillipone, C.B. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun, F. Scala // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 7860-7865.
101. Lorito M. Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides / M. Lorito, C.K. Hayes, A. Zoina, F. Scala, G. Del Sorbo, , G.E. Harman // *Mol. Biotechnol.* – 1994. – Vol. 2. – № 3. – P. 209-217.
102. Lorito M. The molecular cross-talk between *Trichoderma*, plants and pathogens provides new tools for disease control / M. Lorito, S.L. Woo, M. Ruocco, R. Marra, P. Ambrosino, F. Vinale, S. Ferraioli, I. Soriente, S. Gigante, S. Lanzuise, // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
103. Lubeck M. Identification of strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization / M. Lubeck, S.K. Poulsen, P.S. Lubeck, D.F. Jensen, U. Thrane // *FEMS Microbiol. Letters.* – 2000. – Vol. 185. – P. 129-134.
104. Lynd L.R. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. – Vol. 66. – P. 506-577.
105. Mach R. Genetic transformation of *Trichoderma* and *Gliocladium* / R. Mach, S. Zeilinger // *Trichoderma & Gliocladium, Basic biology, taxonomy and genetics.* – 1998. – Vol. 1. – P. 225-242.
106. Mach R.L. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma* / R.L. Mach, S. Zeilinger // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – 60. – P. 515-522.
107. Mach R.L. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals / R.L. Mach, C.K. Peterbauer, K. Payer, S. Jaksits, S.L. Woo, S. Zeilinger, C.M. Kullnig, M. Lorito, C.P. Kubicek // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – P. 1858-1863.
108. Mach, 1998 Mach R.L., Zeilinger S., Kristufek D., Kubicek C.P. Ca²⁺ - calmodulin antagonists interfere with xylanase formation and secretion in *Trichoderma reesei*

// Molecular Cell Research. – 1998. – V.1403 (3). – P. 281-289.

109. Mamarabadi M. Characterization of four chitinase-encoding genes from fungus *Clonostachys rosea* (IK726) / M. Mamarabadi, D.F. Jensen, M. Lubek // 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. – 2006.

110. Mamoun L.M. Interaction between the pathogene *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost / L.M. Mamoun, J.M. Savoie, J.M. Olivier // *Mycologia*. – 2000. – № 92. – P.233-400.

111. Mäntylä A. Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei* / A. Mäntylä, M. Paloheimo, P. Suominen // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 291-309.

112. Marra R. Proteomic investigations into the complex interaction between plant, fungal pathogens and *Trichoderma atroviride* strain P1 / R. Marra, P. Ambrosino, V. Carbone, F. Vinale, S.L. Woo, M. Ruocco, R. Ciliento, S. Lanzuise, S. Ferraioli, I. Soriente, S. Gigante, D. Turra, V. Fogliano, F. Scala, M. Lorito // 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. – 2006.

113. Melander C. Investigation of micro-immobilised enzyme reactors containing endoglucanases for efficient hydrolysis of cellodextrins and cellulose derivatives / C. Melander, M. Bengtsson, H. Schagerlof, F. Tjerneld, T. Laurell, L. Gorton // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – V. 550. – P. 182–190.

114. Menendez A.B. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma harzianum* / A.B. Menendez, A. Godeas // *Mycopathologia*. – 1998. – Vol. 142. – P. 153–160.

115. Merino S. *Trichoderma reesei* as a host for improved cellulose compositions / S. Merino, S. Suchindran, J. Cherry // 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. – 2006.

116. Miettinen-Oinonen. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton / A. Miettinen-Oinonen, M. Paloheimo, R. Lantto, P. Suominen // *J. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 116. – P. 305-317.

117. Miguel D. Nonfatal pulmonary *Trichoderma viride* infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case and review of the literature / D. Miguel, P. Gómez, R. González, J. García-Suárez, J.A. Cuadros, M.H. Bañasa, J. Romanyk, C. Burgaleta // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2005. – Vol. 53. – P. 33–37.

118. Molla A.H. Evaluation of solid-state bioconversion of domestic wastewater sludge as a promising environmental-friendly disposal technique / A.H. Molla, A. Fakhru'l-Razi, Md.Z. Alam // *Water Res.* – 2004. – Vol. 38. – P. 4143-4152.

119. Mumpini A. Effect of Metabolites Produced by *Trichoderma harzianum* Biotypes and *Agaricus bisporus* on Their Respective Growth Radii in Culture / A. Mumpini, H.S.S. Sharma, A.E. Brown // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – №12. – P. 5053-5056.

120. Munoz F.M. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia / F.M. Munoz, G.J. Demmler, W.R. Travis, A.K. Ogden, S.N. Rossmann, M.G. Rinaldi // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 499– 503.

121. Murad A.M.A. Identification of *Trichoderma virens* genes encoding for chitinolytic enzymes using the expressed sequence tag approach / A.M.A. Murad, R. Badrun, Z.Y. Ahmad, Z. Zainal, N.M. Mahadi, F.D.A. Bakar // 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. – 2006.

122. Murashima K. Enzyme endoglucanase and cellulase preparations containing the same / T. Moriya, T. Hamaya, J. Koga, N. Sumida, K. Aoyagi, T. Murakami, T. Kono. – 2000. Pat. US 6,159,720.

123. Muthumeenakshi S. Genetic comparison of aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and the British Isles / S. Muthumeenakshi, A.E. Brown, P.R. Mills // *Mycological Research*. – 1998. – № 4. – P. 385-390.
124. Nagy V. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases of *Gliocladium* and *Chaetomium* origin produced by solid state fermentation / V. Nagy, E.R. Toke, L.C. Kheong, G. Szatzker, D. Ibrahim, I.C. Omar, G. Szakacs. L. Poppe // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
125. Obregon M.G. Experience with *Trichoderma* for disease control and improved yield in Central America // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
126. Ordaz-Ortiz J.J. Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans / J.J. Ordaz-Ortiz, L. Saulnier // *Journal of Cereal Science*. – 2005. № 42. – P. 119-125.
127. Ospina-Giraldo M.D. Molecular phylogenetic analysis of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold // M.D. Ospina-Giraldo, D.J. Royse, X. Chen, C.P. Romaine // *Phytopathology*. – 1999. – № 89. – P. 308-313.
128. Paloheimo M. High-Yield production of the bacterial *Nonomuraea flexuosa* Xyn11A xylanase in *Trichoderma reesei* by expression of a truncated *Nf xyn11A* gene / M. Paloheimo, A. Mäntylä, J. Kallio, T. Puranen, P. Suominen // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
129. Pardovitz-Kedmi E. Development and gene expression in *Trichoderma virens*: insights into biocontrol-related signaling pathways / E. Pardovitz-Kedmi, M. Mukherjee, R. Hadar, N. Trushina, A. Viterbo, I. Chet, B.A. Horwitz, P.K. Mukherjee // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
130. Parshikov I.A. Formation of conjugates from ciprofloxacin and norfloxacin in cultures of *Trichoderma viride* / I.A. Parshikov, J.D. Moody, J.P. Freeman, J.O. Lay Jr., A.J. Williams, T.M. Heinze, J.B. Sutherland // *Mycologia*. – 2002. – Vol. 94. – P. 1-5.
131. Penttilä M. Heterologous protein in *Trichoderma* // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 365-382.
132. Peterbauer C.K. Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1 / C.K. Peterbauer, M. Lorito, C.K. Hayes, G.E. Harman, C.P. Kubicek // *Curr. Genet*. – 1996. – Vol. 30. – № 4. – P. 325-331.
133. Pozo M.J. Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens* / M.J. Pozo, J.-M. Baek, J.M. García, C.M. Kenerley // *Fungal Genet Biol*. – 2004. – Vol. 41. – P. 336-348.
134. Prusky D. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? / D. Prusky, N. Yakoby // *Mol. Plant Pathol*. – 2003. – Vol. 4. – P. 509-516.
135. Rautio J. Transcriptional analysis of *Trichoderma reesei* bioprocesses with the novel TRAC method / J. Rautio, K. Kataja, R. Satokari, M. Penttilä, H. Sodelund, M. Paloheimo // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
136. Reithner B. The G protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites / B. Reithner, K. Brunner, R. Schuhmacher, I. Peissl, V. Seidl, R. Krska, S. Zeilinger // *Fungal Genetics and Biology*. – 2005. – 42. – P. 749-760.
137. Reithner B. Tmk1, a *Trichoderma atroviride* MAP-kinase, and its role in the mycoparasitic response / B. Reithner, R. Schuhmacher, S. Zeilinger // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

138. Rey M. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins / M. Rey, J. Delgado-Jarana, T. Benítez // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 604-608.
139. Rifai M.A. A revision of the genus *Trichoderma* // *Mycol. Pap.* – 1969. – Vol. 116. – P. 1-56.
140. Roldán A. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of Palomino fino grapes in the sherry region / A. Roldán, V. Palacios, X. Peñate, T. Benítez, L. Pérez // *J. of Food Engineering.* – 2005. In press. Rouette H.K. *Encyclopedia of textile finishing* // *Electronic Media.* – 2002. – Springer.
142. Rudresh D.L. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.) / D.L. Rudresh, M.K. Shivaprakash, R.D. Prasad // *Appl. Soil Ecol.* – 2005. – Vol. 28. – Issue 2. – P. 139-146.
143. Sadykova V.S. Control of *Fusarium* species with *Trichoderma asperellum* in combination with organic compounds to coniferous seedlings in Central Siberia / V.S. Sadykova, T.I. Gromovych, T. Ryazanova // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
144. Saloheimo M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials / M. Sa-loheimo, M. Paloheimo, S. Hakola, J. Pere, B. Swanson, E. Nyssonen, A. Bhatia, M. Ward, M. Penttila // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269. – P. 4202-4211.
145. Samuels et al., 1996 Samuels G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus // *Mycol. Res.* – 1996. – Vol. 100. – P. 923-935.
146. Samuels G.J. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus* / G.J. Samuels, S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castl-ebury, O. Petrini // *Mycologia.* – 2002. – № 1. – P. 156-170.
147. Sanz L. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species / L. Sanz, M. Montero, I. Grondona, J.A. Vizcaíno, A. Llobell, R. Hermosa, E. Monte // *Curr. Genet.* – 2004. – Vol. 46. – P. 277-286.
148. Sanz L. Expression of an α -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum* / M. Montero, J. Redondo, A. Llobell, E. Monte // *FEBS Journal.* – 2005. – Vol. 272. – P. 493-499.
149. Savoie J.M. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* spp. and Shiitake, *Lentinula edodes* / J.M. Savoie, G. Mata, C. Billette // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – №49. – P.589-593.
150. Savoie J.M. Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost / J.M. Sa-voie, R. Iapicco, M. Largeteau-Mamoun // *Mycol. Res.* – 2001a. – №105. – P.1348-1356.
151. Savoie J.M. Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. during Shiitake cultivation on pasteurized wheat straw / J.M. Savoie, P. Delpech, C. Billette, G. Mata // In: Van Griensven LJLD, ed. *Science and cultivation of edible fungi.* Rotterdam, The Netherlands: A.A. Balkema, 2000. – P.667-674.
152. Savoie J.M. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulotic activities during cultivation in weat straw / J.M. Savoie, G. Mata // *Word J. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – №15. – P.369-373.
153. Savoie J.M. Variability in brown line formation and extracellular laccase production during interaction between white-rot basidiomycetes and *Trichoderma harzianum*

- biotype Th2 / J.M. Savoie, G. Mata, M. Mamoun // *Mycologia*. – 2001b. – №93. – P.243-248.
154. Schickler H. Electrophoretic characterization of chitinases as a tool for the identification of *Trichoderma harzianum* strains / H. Schickler, B.C. Danin-Gehali, S. Haran, I. Chet // *Mycological Research*. – 1998. – Vol. 103. – P. 373-377.
155. Seaby D. *Trichoderma* as weed mould or pathogen in mushroom cultivation // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 267-287.
156. Segarra G. Salicylic and jasmonic acid quantification in study of plant-*Trichoderma* interactions / G. Segarra, O. Jauregui, E. Casanova, M.I. Trillas // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
157. Sharon E. Biocontrol of root-knot nematodes by *Trichoderma*-direct and indirect interactions / E. Sharon, I. Chet, I. Spiegel // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
158. Shores M. The molecular basis of maize-*Trichoderma harzianum* T22-pathogen interaction / M. Shores, G. Harman // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
159. Silva R.N. Regulation of N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression / R.N. Silva, S.P. da Silva, R.L. Bran-dão, C.J. Ulhoa // *Research in Microbiology*. – 2004. – Vol. 155. – P. 667–671.
160. Singh A. Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting / A. Singh, S. Sharma // *Bioresource Technology*. – 2002. – Vol. 85. – P. 107-111.
161. Smith W.H. Forest occurrence of *Trichoderma* species – emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation// *Ecotoxicol. Environ. Safety*. – 1995. – Vol. 32. – № 2. – P. 179-183.
162. Sørensen H.R. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue / H.R. Sørensen, S. Pedersen, A. Viksø-Nielsen, A.S. Meyer // *Enzyme and Microbiol. Technology*. – 2005. – № 36. – P. 773-784.
163. Soriente I. Integrated use of *Trichoderma harzianum* strains T22 and T39 with cell wall degrading enzymes to control plant diseases / I. Soriente, S. Ferraioli, S. Woo, R. Ciliento, R. Marra, F. Vinale, P. Ambrosino, M. Ruocco, D. Turra, S. Lanzuize, S. Gigante, F. Scala, M. Lorito // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006
164. Steward A. Unravelling the complexity of abiotic influences on *Trichoderma* biocontrol agents / A. Steward, S. Card, J.M. Steyaert, K.L. McLean // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
165. Steyaert J.M. The intrinsic influence of ambient pH on conidiation in biocontrol species of *Trichoderma* / J.M. Steyaert, R.J. Weld, M.A. Carpenter, T.R. Glare, A. Herrera-Estrella, A. Stewart // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
166. Stoppacher N. Screening for atroviridins and harzianins in culture samples of *Trichoderma atroviride* using LC-MS/MS / N. Stoppacher, B. Rethner, S. Zeilinger, K. Brunner, R.L. Mach, R. Krska, R. Schuhmacher // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
167. Stricker A.R. The cellulolytic and xylanolytic enzyme system of *Trichoderma reesei* is governed by *Xyr1* / A.R. Stricker, K. Grobtebner-Hain, R.L. Mach // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
168. Takahashi T. Cyclosporin A promote hair epithelial cell proliferation and modulates protein kinase C expression and translocation in hair epithelial cells / T. Takahashi,

A. Kamimura // *J Invest Dermatol.* – 2001. – Vol. 117. – P. 605-611.

169. Thornton C.R. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested composts / C.R. Thornton, D. Pitt, G.E. Wakley, N.J. Talbot // *Microbiol.* – 2002. – Vol. 148. – P. 1263-1279.

170. Thrane U. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms / U. Thrane, S.B. Poulsen, H.I. Nirenberg, E. Lieckfeldt // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2001. – Vol. 203. – P. 249-255.

171. Thrane U. Trichotecene production by *Trichoderma* species / U. Thrane, K.F. Nielsen, T. Grafenhan // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

172. Trillas M.I. *Trichoderma asperellum* strain T34: biological control and mode of action / M.I. Trillas, E. Casanova, L. Cotxarrera, C. Borrero, G. Segarra, M. Aviles // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

173. Vargas-García M.C. Laboratory study of inocula production for composting processes / M.C. Vargas-García, M.J. López, F. Suárez, J. Moreno // *Bioresource Technology.* – 2005. – Vol. 96. – P. 797-803.

174. Vasseur V. *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls / V. Vasseur, M.V. Montagu, G.H. Goldman // *Microbiol.* – 1995. – Vol. 141. – P. 767-774.

175. Vikineswary S. Growth of *Trichoderma harzianum* and *Myceliophthora thermophila* in palm oil sludge / S. Vikineswary, A.J. Kuthubutheen, A.A. Ravooof // *W. J. of Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – Vol. 13. – № 2. – P. 189-194.

176. Vinale F. *Trichoderma* secondary metabolites: role in interactions with plants and other microorganisms / F. Vinale, K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, M. Barbetti, H. Li, R. Marra, F. Scala, S.L. Woo, M. Lorito // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

177. Viterbo A. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM / A. Viterbo, S. Haran, D. Friesem, O. Ramot, I. Chet // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2001. – Vol. 200. – P. 169-174.

178. Viterbo A. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens / A. Viterbo, O. Ramot, L. Chemin, I. Chet // *Ant. van Leeuw.* – 2002. – Vol. 81. – P. 549-556.

179. Viterbo A. Towards understanding the molecular basis for induced resistance in the *Trichoderma*-plant interaction / A. Viterbo, M. Shores, Y. Brotman, I. Chet // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

180. Vizcaíno J.A. CHIT101, a new high-molecular-weight chitinase from *Trichoderma atroviride* T11 / J.A. Vizcaíno, R.E. Cardoza, M.R. Hermosa, M. Rey, E. Monte, S. Gutierrez // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

181. Vizcaíno J.A. Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413 / J.A. Vizcaíno, L. Sanz, R.E. Cardoza, E. Monte, S. Gutiérrez // *FEMS Microbiology Letters.* – 2005. – Vol. 244. – P. 139-148.

182. Wang T. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* / T. Wang, X. Liu, Q. Yu, X. Zhang, Y. Qu, P. Gao, T. Wang // *Biomolecular Engineering.* – 2005. – Vol. 22. – P. 89-94.

183. Ward M. Improving secreted enzyme production by *Trichoderma reesei* // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

184. Weaver M. Fitness, persistence, and responsiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* in soil mesocosms / M. Weaver, E. Vedenyapina, C.M. Kenerley // *Applied Soil Ecology.* – 2005 in press.

185. Weber J. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production / J. Weber, F.A. Agblevor / *Process Biochemistry*. – 2005. – Vol. 40. – P. 669-676.
186. Wiest A. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase / A. Wiest, D. Grzegorski, B. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D.J. Ebbole, B. Bodo, C. Kenerley // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 20862-20868.
187. Williams J. Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus* / J. Williams, J.M. Clarkson, P.R. Mills, R.M. Cooper // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69. – № 7. – P. 4192-4199.
188. Woo S.L. Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1 / S.L. Woo, B. Donzelli, F. Scala, R. Mach, G.E. Harman, C.P. Kubicek, G. Del Sorbo, M. Lorito // *Plant-Microb Interact.* – 1999. – Vol. 12. – P. 419-429.
189. Xi B. Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste / B. Xi, G. Zhang, H. Liu // *J. of Hazardous Materials*. – 2005. – V. B124. – P. 165–172.
190. Xiong H. Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates / H. Xiong, N. von Weymarn, O. Turunen, M. Leisola, O. Pastinen // *Bioresource Technology*. – 2005. – Vol. 96. – P. 753-759.
191. Yang J. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor / J. Yang, L. Liang, J. Li, K. Zhang // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
192. Yedidia I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants / I. Yedidia, A.K. Srivastva, Y. Kapulnik, I. Chet // *Plant Soil*. – 2001. – Vol. 235. – P. 235-242.
193. Zaldívar M. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol / M. Zaldívar, J.C. Velásquez, I. Contreras, L.M. Pérez // *EJB Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458. – 2001. – Vol. 4. – № 3, Issue of December 15.
194. Zayed G. Bio-active composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorous nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea / G. Zayed, H. Abdel-Motaal // *Bioresource Technology*. – 2005. – Vol. 96. – P. 929-935.
195. Zembek P.B. Improvement of biocontrol properties of *T. atroviride* P1 strain by increased glycosylation abilities / P.B. Zembek, K. Brunner, B. Rethner, G. Palamaczyk, S. Zeilinger, R.L. Mach, J.S. Kruszewska // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
196. Акберова Н.И. О клонировании генов целлюлаз в дрожжах / Н.И. Акберова, А.А. Кулаков, О.В. Шаландина, В.Г. Винтер // *Сб.: Методы получения и анализа биохимических препаратов*. – Рига. – 1987. – С. 62.
197. Акберова Н.И. Прямое клонирование генов целлюлазного комплекса / Н.И. Акберова, В.Г. Винтер, М.Н. Капранова, Н.Н. Кузнецова, Н.Г. Уразов, А.А. Кулаков, О.В. Шаландина, Т.В. Новикова // *Сб.: Генная и клеточная инженерия в решении фундаментальных проблем биотехнологии*. – Тарту. – 1989. – Т. 1. – С. 29-36.
198. Александрова А.В. Первая находка *Trichoderma satumisporum* в России / А.В. Александрова, Великанов Л.Л. // *Микол. и фитопатол.* – 1999. – Т. 33, вып. 5. – С. 304-306.
199. Алимова Ф.К. Взаимоотношения *Trichoderma*, распространенной на территории республики Татарстан, с микроорганизмами и растениями / Ф.К. Алимова, Р.И. Тухбатова, Д.И. Тазетдинова, Ф.Х.А. Кабрера, Л.Ю. Каримова // *Грибы и водоросли в биоценозах* – 2006: Материалы

международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января - 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 12-13.

200. Великанов Л.Л. Роль грибов в формировании мико- и микробиоты почв естественных и нарушенных биоценозов и агроценозов. Дисс... д.б.н. – М., 1997. – 547 с.

201. Великанов Л.Л. Сравнение гиперпаразитической и антибиотической активности изолятов рода *Trichoderma pers.*: Fr. и *Gliocladium virens* Miller, Giddens et Foster по отношению к патогенам, вызывающим корневые гнили гороха / Л.Л. Великанов, Е.Ю. Сухоносенко, С.И. Николаева, И.Л. Завелишко // Микология и фитопатология. – 1994. – Т. 28. – Вып. 6. – С. 52-56.

202. Великанов Л.Л. Сравнение гиперпаразитической и антибиотической активности изолятов рода *Trichoderma pers.*: Fr. и *Gliocladium virens* Miller, Giddens et Foster по отношению к патогенам, вызывающим корневые гнили гороха / Л.Л. Великанов, Е.Ю. Сухоносенко, С.И. Николаева, И.Л. Завелишко // Микология и фитопатология. – 1994. – Т. 28. – Вып. 6. – С. 52-56.

203. Винтер В. Г., Кузнецов Н. К., Уразов Н. Г., Королева Л. И., Новикова Т. В. Экспрессия генов целлюлазного комплекса *T. viride* F-90 в клетках *E. Coli* IF1125. // Сборник тезисов «Новые направления биотехнологии». – Пушкино-на-Оке, 1-3 октября 1986 ИБ МАНН СССР.

204. Гайда А.В. Выделение и сравнительная характеристика сериновых протеиназ микроскопических грибов *Trichoderma lignorum* и *Trichoderma koningii* / А.В. Гайда, Г.Н. Руденская, В.М. Степанов // Биохимия. – 1981а. – Т. 46, вып. 11. – С. 2064-2073.

205. Гайда А.В. Карбоксильные протеиназы микроскопических грибов *Trichoderma viride* и *Trichoderma lignorum* / А.В. Гайда, А.Л. Остерман, Г.Н. Руденская, В.М. Степанов // Биохимия. – 1981б. – Т. 46, вып. 1. – С. 181-189.

206. Гернер М.Л. Поликлональная антисыворотка к некаталитической части целлобиогидролазы I из *Trichoderma reesei* / М.Л. Гернер, Г.В. Леонтьева, И.Г. Роменская, М.С. Мельник, М.Л. Рабинович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – №1. – С. 5-7.

207. Гринько Е.К. Экологически безопасная система защиты овощных культур закрытого грунта от фитопатогенов // Рекомендации. – Краснодар: Агрпромпполиграфист, 2000. – 44 с.

208. Гринько Н.Н. Биотехнологические аспекты культивирования штамма *Trichoderma harzianum* Rifai ВКМ F-2477Д // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук. – 2004. – №1. – С. 57-61.

209. Гринько Н.Н. Влияние фунгицидов на филлоплану огурца / Н.Н. Гринько, Г.Д. Успенская // Защита растений. – 1987. – №8. – С. 37.

210. Гринько Н.Н. Экологические аспекты регулирования популяций фитопатогенных микромицетов овощных культур в закрытом грунте. Автореф. дис. ... док.биол.наук. – М.: МГУ, 2001. – С.37.

211. Громовых Т.И. Фитопатогенные микромицеты сеянцев хвойных в Средней Сибири: видовой состав, экология, биологический контроль // Автореф. диссертации... доктора биологических наук. – Москва, 2002.

212. Громовых Т.И., Гукасян В.М., Голованова Т.И., Шмарловская С.В. *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. как фактор повышения устойчивости томатов к возбудителям корневой гнили // Микология и фитопатология. – 1998. – Т.32. – Вып.2. – С. 73-78.

213. Дунаевский Я.Е. Секретируемые ферменты мицелиальных грибов: регуляция секреции и очистка внеклеточной протеиназы *Trichoderma harzianum* / Я.Е. Дунаевский, Т.Н. Грубань, Г.А. Белякова, М.А. Белозерский // Биохимия. – 2000. – Т.

65. – Вып. 6. – С. 848-853.

214. Дурынина Е.П. Использование микробных биоактиваторов для получения торфо-поемных компостов / Е.П. Дурынина, О.А. Пахненко // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии». – Воронеж 18-19 мая 2004 г. – С. 10.

215. Квасенков О.И. Способ приготовления углеводсодержащего желирующего концентрата для кондитерских изделий / О.И. Квасенков, Р.И. Шаззо. – 2001. Патент РФ (19) RU(11) 2 254 026 (13) С2 (51) МПК 7 А 23 L 1/0524, 1/06, А 21 D 2/36, С 12 Р 1/02 СПб.: ГИОРД. – С. 204-205.

216. Кокшарова А.В. Микробная биоконверсия органических отходов и торфа, оценка эффективности биокомпостов / А.В. Кокшарова, О.А. Пахненко // 9-я Пушкинская конференция молодых ученых, Пушкино. – 2005.

217. Коломбет Л.В. Биологическая эффективность *Trichoderma asperellum* GJS 03-35 и дрожжей *Cryptococcus nadoensis* ОН 182.9 // Микология и фитопатология. – 2005. Т. 39. – Вып.5. – С. 80-88.

218. Коломбет Л.В. Микофунгицид – препарат на основе *T. viride* для борьбы с болезнями растений / Л.В. Коломбет, С.К. Жиглецова, В.В. Дербышев, Д.В. Ежов, Н.И. Косарева, Е.В. Быстрова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т.37. – №1. – С. 110-114.

219. Коломбет Л.В. Обоснование оптимальных доз биопрепарата Микол (на основе *Trichoderma asperellum*) для озимой пшеницы // Журнал АгроХХ101.12.2005. – 2005.

220. Кучмина Е.Ю., Алимова Ф.К., Киямова С.Н., Иванченко О.Б. Влияние *Trichoderma harzianum* на токсические и мутагенные свойства почвы // Тез. докл. Всероссийской конференции «Сельскохозяйственная микробиология в XIX-XXI веках», Санкт-Петербург. – 2001 – С. 30-31.

221. Литовка Ю.А. Влияние биоконтрольных штаммов *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* на биологическую активность и структуру микробиоценоза почвы / Ю.А. Литовка, Т.И. Громовых, В.М. Гукасян // Сибирский экологический журнал. – 2002. – № 3. – С. 371-376.

222. Маркович Н.А. Литические ферменты *Trichoderma* и их роль при защите растений от грибных болезней (обзор) / Н.А. Маркович, Г.Л. Кононова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39. – № 4. – С.389-400.

223. Марфенина О.Е. Микроскопические грибы во внешней среде города / О.Е. Марфенина, А.Б. Кулько, А.И. Иванова, М.В. Согонов // Микология и фитопатология. – 2002. – Т. 36. – Вып. 4. – С. 22-27.

224. Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Trichoderma longibrachiatum* TW-1 – продуцента β-глюканазы в воздухе рабочей зоны. МУК 4.2.1070-01. – Инф.-Изд. центр Минздрава России, 2002.

225. Митрофанов В.С. Плесени в доме (обзор) / В.С. Митрофанов, Я.И. Козлова // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 6. – №2. – С. 10-18.

226. Никонов И.Н. Активность лакказы *Trichoderma* sp. при взаимодействии с бактериями и грибами // Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января – 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 113-114.

227. Новаковская С.С. Справочник технолога дрожжевого производства. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 288 с.

228. Околелова Т.М. Корма и ферменты / Т.М. Околелова, А.В. Кулаков, С.А. Молоскин., Д.М. Грачев. – Сергиев Посад: ВНИТИП. – 2001. – С. 9-45.

229. Сидорова И. И. Биологические методы борьбы с фитопатогенными грибами // Итоги науки и техники. Сер. Защита раст. – М.: ВИНТИ, 1980. – Т. 2. – С.

116-157.

230. Синчурина Е.В. Влияние ризосферных микромицетов на рост и развитие растений / Е.В. Синчурина, Н.С. Жемчужина, Т.К. Крашенникова // Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января - 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 143-145.

231. Скворцов Е.В. Биосинтез кормовых ксиланазных ферментных препаратов грибами *Trichoderma* и бактериями рода *Bacillus* / Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова, В.И. Вершинина, Р.И. Тухбатова // Материалы Международной научно-практической конференции «Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экологического пространства стран содружества» 25-28 мая, 2005. Минск-Нарочь, Республика Беларусь. – Мн, 2005. – С. 226.

232. Скворцов Е.В. Биосинтез ксиланаз аборигенными изолятами *Trichoderma* / Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова, Д.М. Абузярова // Вестник казанского технологического университета. – Казань: Отечество. – №1. – 2005. – С. 251-255.

233. Скворцов Е.В. Исследование ферментных препаратов грибов *Trichoderma* и бактерии *Bacillus*, деградирующих трудногидролизуемые компоненты растительной биомассы / Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова, В.И. Вершинина, А.К. Халиллулина, Д.М. Абузярова // Материалы научной конференции «Проблемы биотехнологии в сельском хозяйстве». – Казань: КГСХА, 2005. – С. 31-32.

234. Смирнов И.А. Эффективность действия стерилизующих агентов на ассоциативные микроорганизмы лишайников / И.А. Смирнов, Е.С. Лобакова // 2006). – Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января - 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 149-150.

235. Соколова Г.Д. Дезоксиваленон как биохимический фактор взаимодействия гриба с биотическими компонентами среды обитания / Г.Д. Соколова, О.Л. Рудаков, Г.А. Девяткина // Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января - 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 150-151.

236. Ташпулатов Ж. Грибы рода *Trichoderma Pers.*: Фг. и их использование при переработке отходов растениеводства // Автореферат дис. д.б.н. – М., 1987. – С.45.

237. Терехова В.А. Взаимодействие грибов и бактерий в ходе очистки нефтесодержащих природных сред / В.А. Терехова, И.З. Ибатуллина, Т.О. Попутникова // Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января - 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 159-160.

238. Титова Ю.А. Двухэтапная биоконверсия отходов с помощью *Pleurotus ostreatus* и *Trichoderma harzianum* / Ю.А. Титова, Л.Б. Хлопунова, Д.В. Коршунов // Микология и фитопатология. – 2002. –Т. 36. – Вып.5. – С. 64-70.

239. Чегодаев В. Ферменты в ячменно-пшеничном рационе кур-несушек / В. Чегодаев, Г. Жданкова, О. Мерзлякова // Птицеводство. – 2004. – №4.

240. Штерниш М.В. Грибные препараты / М.В. Штерниш, Ф.С. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова // Биологическая защита растений. – М: Колос, 2004. – С. 195-198.

241. Штырлина О.В. К вопросу о взаимоотношениях почвенных микромицетов с микро- и макроорганизмами как основа формирования агроценозов / О.В. Штырлина, Д.А. Штырлин // Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января - 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 182-183.

**Алимова
Фарида Кашифовна**

Промышленное применение грибов рода
Trichoderma

Главный редактор Н.И.Колосова
Компьютерная верстка Е.Х.Абдрахмановой
Дизайн обложки Е.Х.Абдрахмановой

Подписано в печать 29.05.06. Бумага офсетная.
Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Таймс».
Печать ризографическая. Усл.печ.л. 12,20.
Уч.-изд.л 13,12. Тираж 500 экз. Заказ 6/72

**Издательство
«Казанский государственный университет
им.В.И. Ульянова-Ленина»**

Отпечатано
в типографии Издательского центра
Казанского государственного университета
им.В.И. Ульянова-Ленина

420008, г.Казань, ул.Университетская, 17
тел. 231-53-59, 292-65-60