СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОТЕХНОЛОГИЯ

Орлин Цветанов Гемишев

Оптимизиране синтезата и получаване на целулазни ензими от микромицетни продуценти

АВТОРЕФЕРАТ

на

Д И С Е Р Т А Ц И Я

за придобиване на образователна и научна степен **„ДОКТОР”**

По научна специалност 5.11

„Биотехнологии (Технология на биологично активните вещества)“

Научен ръководител: Проф. д-р Атанас Атев

СОФИЯ
2016

Дисертационният труд съдържа 179 страници, 32 таблици и 34 фигури.
В библиографската справка са включени 332 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден на разширен учебно-научен съвет при катедра Биотехнология, СУ „Св. Климент Охридски", на заседание състояло се на 14. 03. 2016 г. и е насочен за разкриване на процедура за защита пред научно жури, сформирано със Заповед №..... на Ректора на СУ "Св. Климент Охридски".

Научно жури:

1. Доц. д-р Валентин Александров Савов

2. Проф. д-р Венета Михова Капчина-Тотева

3. Проф. дбн Милка Асенова Кръстева

4. Проф. д-р Райчо Йонков Димков

5. Доц. д-р Александър Борисов Рътков

Официалната защита на дисертационния труд ще се проведе на .....от …… часа в Заседателната зала на Биологическия факултет към СУ „Св. Климент Охридски".

Използвани съкращения

b.p.	-	базови двойки
CBH	-	Целобиохидролаза
CFU	-	Колония Образуващи Единици
C-източник	-	Въглероден източник
EG	-	Ендоглюканаза
FPA	-	Filter Paper Activity
ITS	-	Вътрешни Транскрибируеми Спейсери/ Internal Transcribed Spacer
IUPAC	-	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS	-	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
MS среда	-	Среда на Murashige and Skoog
pNPG	-	p(4)-нитрофенил- β-D-глюкопиранозид
SRAP	-	Sequence Related Amplified Polymorphism
TLD/ТЛД	-	Термо-Луминесцентни Дозиметри
АСБ	-	Абсолютно Суха Биомаса
БАВ	-	Биологично Активни Вещества
ДК	-	Диализен Концентрат
ИА	-	Изопентенил Аденин
ИВЕРИ	-	Импулсно Високо-Енергетично Рентгеново Излъчване
ИОК	-	Индолил-3-Оцетна Киселина
КМЦ	-	Карбокси Метил Целулоза
КДА	-	Картофено-Декстрозен Агар
КТ	-	Културална Течност
МП	-	Магнитно Поле
ПФ	-	Плазмен Фокус
СМП	-	Статично Магнитно Поле
СДО	-	След-Диализен Остатък

I. Увод

Ензимните препарати, участващи в биоконверсията на растителната биомаса, са намерили своето място в различни производствени отрасли. Повишеният интерес към тях е свързан с интензивното търсене на хранителни източници, получени от отпадни материали, както и от разкриването на нови енергийни източници, чиито възобновяем запас е практически неограничен.

Хидролизата на целулозата до глюкоза, с помощта на биотехнологични агенти, може да бъде използвана за производството на фуражен белтък, на спирт за енергийни цели, а също така да стане изходен продукт за получаване на други индустриално значими химични съединения. Разграждането на целулозата, чрез целулолитични ензими се явява икономически изгоден, съответно перспективен начин за извършване на този процес. По тази причина целулазите се прилагат в различни производства (пивоварство, хлебарство, текстилната, хранителна промишленост и др.).

Предимствата на хидролизата, осъществявана с помощта на ензимни препарати, пред химичната и физична деградация на целулозата, са „меките“ условия (нормално налягане, ниски температури, pH в интервал 3,5-9), при които се извършва разграждането на целулозните материали.

Възможността да се използват отпадни продукти от други производства, като компоненти в хранителните среди за култивиране на ензимните продуценти, позволява достигането до безотпаден технологичен режим, в рамките на един стопански цикъл.

В екологичен аспект, целулазите са подходящо средство за утилизиране на непрекъснато нарастващото количество целулозосъдържащи отпадъци от различните области на човешката дейност, ускорявайки естествената трансформация на растителната биомаса.

II. Цел и задачи

Приложението на целулазите в различни промишлено значими отрасли, както и използването на род *Trichoderma* за утилизиране на целулозосъдържащи отпадъци и почвена ремедиация, предполага необходимостта от все по-детайлно проучване на целулазната синтеза, механизма на действие и индукция на целулазните ензими.

Във връзка с това е поставена целта на настоящата работа:

Охарактеризиране и оптимизиране целулазната биосинтеза на щамове от род Trichoderma, и изследване влиянието на химични и физични фактори върху целулолитичната активност.

Реализирането на така формулираната цел е осъществено с решаването на следните задачи:

1. Подбор на щамове *Trichoderma reesei* продуценти на целулазни ензими.

   1.1. Установяване на биосинтетичения потенциал, морфологичните и физиолого-биохимични особености на подбраните щамове.

1.2. Генетична идентификация на продуцентите и установяване степента на полиморфизъм между експерименталните щамове.

2. Оптимизиране състава на агаризираните, посевните и ферментационните хранителни среди за култивиране.

2.1. Изследване влиянието на различни въглеродни източници в агаризираните хранителни среди (среди за поддържане на продуцентите) върху целулазната активност.

2.2. Отчитане влиянието на въглеродния компонент в посевните среди при натрупването на вегетативен материал и синтеза на целулази във ферментационни условия.

2.3. Култивиране на изследвания продуцент върху някои безцелулозни субстрати и проследяване на целулолитичната активност.

2.4. Обогатяване на ферментационната хранителна среда с моно- и дизахариди в индуктивни количества и проследяване измененията в целулазната активност на продуцентите.

3. Изследване влиянието на някои растителни растежни регулатори върху биосинтетичния потенциал на продуцента.
4. Отчитане влиянието на статично магнитно поле върху натрупването на биомаса и синтеза на целулази от биообекта.
5. Облъчване на продуцента с Импулсно Високо-Енергетично Рентгеново Излъчване (ИВЕРИ) и проследяване физиолого-биохимичните промени настъпили в експерименталния щам.
6. Изследване влиянието на различни лиопротектори и установяване степента на преживяемост на микромицетния споров материал в процеса на лиофилизация.
7. Проучване ефекта на биологично активните вещества синтезирани от *Trichoderma reesei* върху растежа *in vivo* на тест растения.

III. Материали и методи

1. Микроорганизми

Експериментите са проведени с щамовете *Trichoderma reesei* QM9414; M27G; M7 и M17, предоставени от микробиологичната колекция на катедра Биотехнология, Биологически факултет при Софийски Университет „Св. Климент Охридски“.

2. Хранителни среди

2.1. Хранителни среди за поддържане на щама

2.2. Хранителни среди за получаване на посевен материал

2.3. Хранителни среди за дълбочинна ферментация

Основната ферментационна среда за синтезата на целулазни ензими от плесенни щамове е композирана от Mandels (1957).

3. Получаване на посевен материал от експерименталните щамове

3.1. Получаване на споров материал

3.2. Получаване на вегетативен посевен материал

4. Култивиране на изследваните щамове при дълбочинни условия за синтеза на целулази

Ферментационните среди са инокулирани с 20% вегетативен посевен материал. Процесът на дълбочинно култивиране е осъществен при температура 28° C, на клатачен апарат, при 220 rpm.

5. Асимилация на въглеродни източници

6. Асимилация на азотни източници

7. Аналитични методи

7.1. Определяне на редуциращите вещества

Редуциращите захари са определени по метода на *Somogyi–Nelson* (Somogyi, 1952).

7.2. Методи за определяне на ензимните активности

Възприетите от нас методи за изследване отделните ензимни активности влизащи в състава на целулазният комплекс са в съответствие с препоръчаните от International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

7.2.1. Определяне на ендо-1,4-β-глюканазна активност (Wood and Bhat, 1988)

Методът се основава на количествено определяне на редуциращите вещества (Somogyi, 1952), които се освобождават при хидролизата на Na-КМЦ като субстрат на ензимното действие.

7.2.2. Определяне на FPA (обща целулазна/целобиохидролазна) активност (Ghose, 1987)

FPA активността е отчетена с използването на, филтърна хартия Whatman №1 (ленти 1 x 6 cm), като субстрат за определяне на общата целулазна активност.

7.2.3. Определяне на β-глюкозидазната активност (Petrova et al., 2002)

β-глюкозидазната активност се отчете с използването на p(4)-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид (pNPG) като субстрат на ензимното действие.

7.2.4.Определяне на ендоксиланазна активност (Ghose and Bisaria, 1987)

Количествено ксиланазната активност е определено чрез спектрофотометричен метод, измерващ редуциращите вещества получени при хидролизата на субстрата – ксилан.

7.2.5.Определяне на лихеназна активност (β-глюканазна активност)

Методът се основава на измерването на редуциращите вещества от субстрата – лихенин под каталитичното действие на ензима.

7.2.6.Определяне на ламинариназна активност (β-1,3 глюканазна активност) (Sharma and Nakas, 1987)

Субстрат за действието на ензима е ламинарин, разтворен в цитратно-фосфатен буфер с pH 5,0.

7.3. Определяне на количеството екзоклетъчен белтък (Lowry et al., 1951)

8. Изследване влиянието на pH върху ензимната активност

Влиянието на pH върху ензимната активност е изследвано в интервала от 2,5 до 8.

9. Определяне влиянието на температурата върху ензимната активност

Влиянието на температурата върху ензимната активност е изследвано в температурния интервал от 20°C до 80°C.

10. Измерване на абсолютно суха биомаса (АСБ)

Абсолютно сухата биомаса е измерена с везна за отчитане на абсолютно сухо тегло KERN, при режим на загряване от 105°C. Резултатите са отчетени през 30 min до три повторения без изменение.

11. Методи за генна идентификация

11.1. ITS-анализ Видова идентификация на щамовете (ITS-анализ)

Видовата принадлежност на изходния и мутантен щам, към *Trichoderma reesei,* е потвърдена с помощта на специализиран софтуер *TrichOKey v. 2* (Druzhinina et al., 2005), достъпен онлайн на интернет адрес http://www.isth.info/tools/molkey/. За анализа са използвани нуклеотидните последователности на вътрешните транскрибируеми спейсери ITS1 и ITS2, разположени между гените за рРНК. Секвенирането на геномния фрагмент, носещ междугенните спейсери, е осъществено с помощта на стандартна праймерна комбинация, по метода на Санджер (Sanger and Coulson, 1975) от компанията Macrogen.

Консенсус последователностите на междугенните спейсери на двата щама са получени след обработка на суровите секвенционни данни с помощта на софтуерния пакет BioEdit 7.1.9 (Hall, 1999).

11.2. SRAP анализ

Получените проби геномна ДНК са използвани за PCR амплифициране на SRAP фрагменти с комбинации от ‘ME’ и ‘EM’ праймери, конструирани според *Li and Quiros, 2000.*

PCR продуктите са разредени в съотношение 1:10 с вода. Един микролитър от разредената PCR реакционна смес бе смесена с 0.5 μL ABI-500 LIZ стандарти за големина на ДНК фрагменти и 9 μL от Hi-Di Formamide (Applied Biosystems). Получената смес е денатурирана чрез загряване на 95°C за 3 min и анализирана чрез капилярна електрофореза с автоматичния капилярен секвенатор Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer и полимер POP-7 (Applied Biosystems). Големината на получените SRAP фрагменти във всяка проба е определена чрез GeneMapper Analysis Software v4.0 (Applied Biosystems). При анализа са отчитани всички SRAP фрагменти, чийто флуоресцентен сигнал е по-висок от 350 относителни флуоресцентни единици (rfu).

Фрагментният анализ е проведен за фрагменти в интервала на 50–950 b.p. След сравняване на спектъра на получените SRAP фрагменти от една праймерна двойка при отделните проби, за всяка проба е изготвен цифров спектър, в който с ‘1’ е означено присъствието, а с ‘0’ отсъствието на съответния фрагмент. Филогенетичният анализ е извършен с FAMD v1.3, *Schluter & Harris 2006.*

12. Третиране на експерименталния щам с растителни растежни регулатори

Фитохормоните изопентенил аденин (ИА) и индолил-3-оцетна киселина (ИОК) са добавени в микромоларни концентрации (1, 1,5 и 10 μM) директно в културалната среда - поотделно, и в комбинация от 0,75 μM ИА - 0,25 μM ИОК и 0,25 μM ИА - 0,75 μM ИОК. Проследено е влиянието на използваните фитохормони върху ендоглюканазния ензимен синтез.

13. Диализа на културална течност

Културалната течност е подложена на диализа с цел разделяне на високомолекулните целулазни ензими от нискомолекулните фитохормонални съединения.

Диализата на културалната течност е извършена след предварително филтруване през бактериален филтър и центрофугиране за 10 min при 4000xg (за отстраняване на мицелната маса). Използваното диализно черво (Sigma-Aldrich) е с големина на порите от 12 400 kD.

14. Влияние на статично магнитно поле (СМП) върху биопродуцента

Влиянието на СМП върху продуцента е отчетено на трите технологични етапа: намножаване върху агаризирана среда за поддържане (КДА), посевно и ферментационно култивиране. Приложените магнитни интензитети са от 5 до 400 mT. Използваните магнити са неодимови (NdFeB) и феритни.

15. Облъчване на споров материал с ПФ и влияние на Импулсно Високо-Енергетично Рентгеново Излъчване (ИВЕРИ) върху продуцента

15.1. Плазмен фокус

За получаване на Импулсно Високо-Енергетично Рентгеново Излъчване - ИВЕРИ (с което въздействахме върху щама в нашите изследвания), е използвано устройство – Плазмен фокус.

В експеримента е използван плазмен фокус тип Мадер.

Плазмата е образувана от работен газ аргон, който при своето нагряване под влияние на протичащия ток освобождава заредени частици, които при сблъсъка си с волфрамов анод освобождават високо енергийно рентгеново лъчение с характерен спектър.

15.2. Импулсно високо енергетично рентгеново излъчване

Импулсният характер на излъчването е обусловен от продължителността на процеса в Плазмения фокус (от порядъка на десетки до стотици наносекунди). При импулсното облъчване се наблюдава голяма плътност на потока от рентгенови фотони. Импулсният режим на облъчване се отличава от постоянния такъв (със същата доза), по високата скорост, с която енергетичната доза се натрупва.

15.3. Подготовка на споровия материал за облъчване, облъчване и аналитични процедури

На облъчване е подложена култура от опитния щам развита върху картофено-декстрозен агар и споров материал от щама суспендиран в натриев хлорид с две гъстоти: 2.10^{5} и 2.10^{6} CFU/ml.

Погълнатите от микромицетната култура дози рентгеново лъчение са зададени в интервал от около 4 до 45 000 mSv.

15.4. Ефект на метални йони върху ензимната активност

Ефектът на различните двувалентни метални йони е проучен след инкубиране на културален филтрат с 1, 5 и 10 mM разтвори на използваните съединения при температура от 23°C, за 30min. Отчетени са промените в ендоглюканазната активност по начин описан в точка 7.2.1. от настоящият раздел.

Проучванията са осъществени както с филтрат, получен след култивиране на варианти облъчени с ИВЕРИ, така и с контролен вариант нетретиран с Плазмен Фокус.

16. LC-MS анализ на съдържанието на фитохормони в културална течност, получена след култивиране на Trichoderma reesei

Анализите са направени на LTQ Orbitrap® Discovery equipped, оборудван с Surveyor® HPLC система и IonMax® HESI II електроспрей йонизационен модул (ThermoScientific Co, USA). Събирането и обработката на данните са осъществени със софтуерния пакет XCalibur® (Thermo Scientific Co, USA).

17. Лиофилизация (сублимационно сушене) на споров материал от биообекта в някои лиопротектори

В проведените изследвания като лиопротектори бяха използвани следните съединения: глюкоза (10%), захароза (10%), натриев глутамат (10%), лактоза (10%), обезмаслено мляко (10%) и комбинация от захароза (5%)+желатин (0,75%)+обезмаслено мляко (5,5%).

Споров материал с гъстота 1.10^6 CFU/ml е суспендиран в изброените лиопротектори, след което е проведен процеса на лиофилизация.

Лиофилизацията е извършена в лабораторна вакуумно-сублимационна инсталация SMH-15 на фирма USIFROID (Франция). Процесът протече за 24 часа.

Степента на преживяемост е отчетена чрез посев на рехидратирания материал върху КДА и термостатирането му за 7 денонощия при 28°C.

18. Проследяване влиянието на Биологично Активни Вещества (БАВ), синтезирани от щама, върху растежа на семена от грах in vivo

За извършване на изследванията е използвана модификация на метода описан от Еспиноза-Руиз (Espinosa-Ruiz et al., 2015). Семената предварително се стерилизират в 70% спирт, за 60 min при разбъркване от 220 rpm. Поставят се в петриева паничка с разлята агаризирана MS среда (Murashige and Skoog, 1962) – 20 ml. Увиват се в алуминиево фолио и престояват два дни в хладилник на 4°C, след което петритата се разделят на две групи: първата се съхранява пет денонощия на тъмно, втората пет денонощия в режим светло- 8 часа/тъмно-16 часа. Температурата на инкубиране е 21-24°C.

19. Обработка на резултатите

Данните от проведените експерименти са обработени с програмата Microsoft Office Excel. Средните стойности и стандартните отклонения (SD) са определени от най-малко три независими повторения.

IV. Резултати и обсъждане

1. Подбор на щамове Trichoderma свръхпродуценти на целулазни ензими

Изолирането и селекцията на перспективни целулазни продуценти е първото важно условие за промишлено производство на ензимни препарати. Към биообектите с индустриално приложение са предявяват изисквания (Атев, 2005) като:

- Висока хидролитична активност.

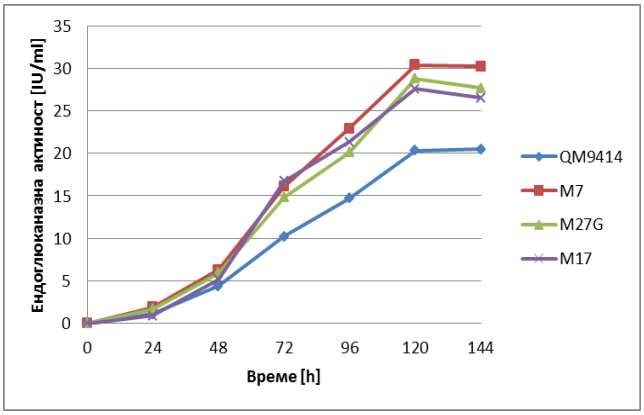
- Синтезата на продукта да е в максимално кратък ферментационен период.
- Да синтезира биопродукти в евтина хранителна среда, без добавяне на скъпо струващи субстанции като индуктори на синтезата.
- Продуцентът да синтезира пълния набор от индивидуални ензими, изграждащи целулазния комплекс.
- Екстрацелуларна синтеза на целулазните ензими.
- Синтеза на съпътстващи ензими, подпомагащи действието на основните е предимство при хидролизата на целулозосъдържащи субстрати.

Множеството подходи, които съвременната наука прилага за биодеградацията на целулозата, показват, че в многообразието от методи няма привилегировани, когато стремежът е максимално оползотворяване енергийния и биологичен потенциал на природната среда.

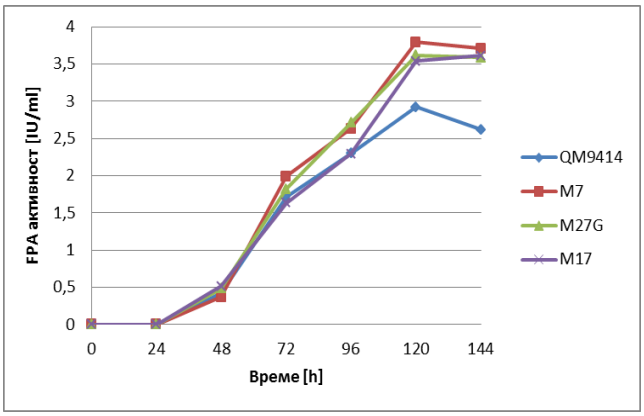
1.1. Сравнително охарактеризиране целулазния потенциал на експерименталните щамове

Основно значение при подбора на работни щамове е целулазната активност на биопродуцента. Щамове *Trichoderma reesei* QM9414, M7, M27G и M17, част от микробиологичната колекция на катедра „Биотехнология“ на СУ, са изследвани за способността им да синтезират целулазни ензими. Проведена е дълбочинна ферментация с използването на хранителна среда на Манделс, съдържаща 2% Авицел (кристална целулоза) като целулазен субстрат. Посевът е осъществен с вегетативен посевен материал - 20% спрямо обема на ферментационната хранителна среда.

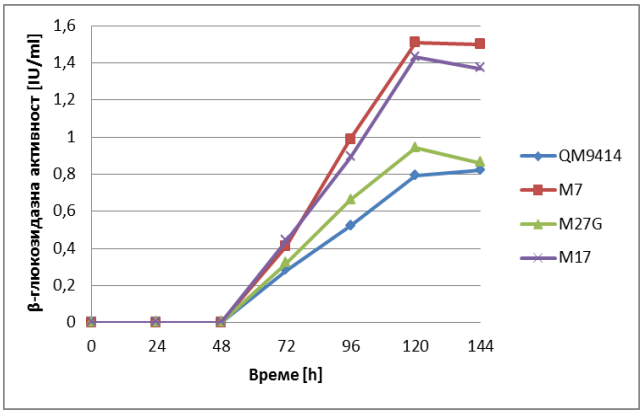
Активността на целулазните ензими и освободения екзоклетъчен протеин са определяни през 24-часа, от началото на ферментацията до 144-я час. Измерените активности са: ендоглюканазна, FPA-целобиохидролазна и β-глюкозидазна. Резултатите са представени на фигури 1,2 и 3 и таблица 1.



Фигура 1. Ендоглюканазни активности [IU/ml] на T. reesei - QM9414, M7, M27G и M17



Фигура 2. FPA активности [FPU/ml] на T. reesei - QM9414, M7, M27G и M17



….

Фигура 3. β-глюкозидазни активности [IU/ml] на T. reesei - QM9414, M7, M27G и M17

Таблица 1. Общ разтворим белтък [mg/ml]освободен в културалната течност от T. reesei -QM9414, M7, M27G и M17

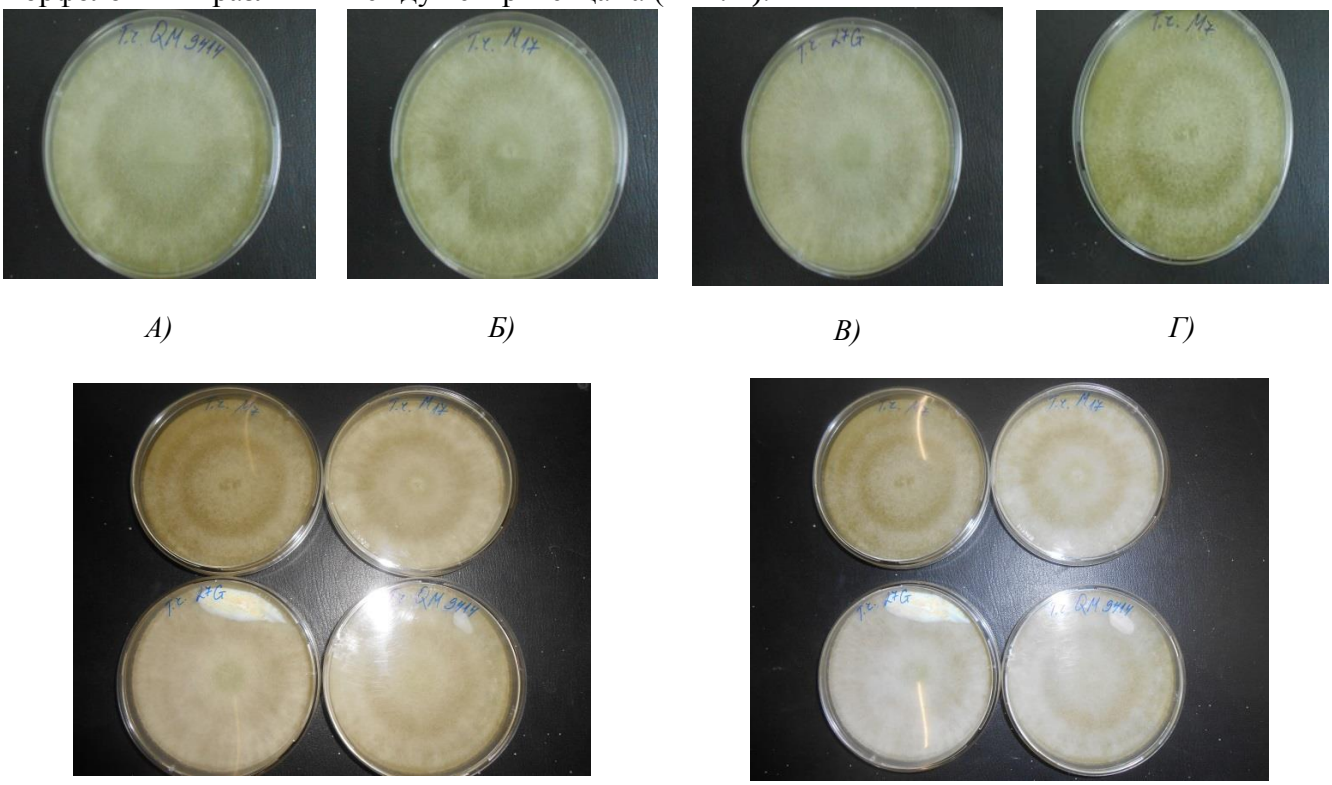
Щам продуценти	*Общ белтък [mg/ml]*					
	24h	48h	72h	96h	120h	144h
QM9414	0,68	1,16	1,79	1,94	2,04	2,27
M7	0,73	1,22	1,86	2,01	2,11	2,34
M27G	0,71	1,27	1,85	2,07	2,15	2,39
M17	0,53	1,18	1,76	1,98	2,09	2,28

От проведените експерименти е установено, че изследваните щамове получени вследствие мутагенно третиране M7, M17 и M27G (Atev et al., 1983, 1987) имат близки целулазни активности, докато референтният щам QM9414 проявява значително по-нисък биосинтетичен потенциал по отношение на трите измерени активности. Максимална синтеза, при всички опитни биообекти, се наблюдава на 120-я час от началото на ферментацията. Най-висока ендоглюканазна, FPA и β-глюкозидазна активност показва щам M7, получен в катедрата след третиране на родителския продуцент с комбинация от UV и нитрозогуанидин (Atev et al.,

1987). Отчетените хидролазни максимуми при М7 са: ендоглюканазна активност - 30,4 IU/ml; FPA-целобиохидролазна - 3,79 FPU/ml; β-глюкозидазна – 1,51 IU/ml .

1.2. Морфологична характеристика на изследваните продуценти

При култивиране и на четирите изследвани щама върху КДА, те развиват силно разклонен мицел. До развиването на въздушен мицел, субстратният се разпростира радиално от центъра на колонията към периферията на агара. Въздушният мицел е белезникав на цвят, като неговото обособяване започва на 36/48-я час от посева. На 72-я час от засяването мицелът заема цялата повърхност на петрито (90mm). Прави впечатление отсъствието на съществени морфологични различия между четирите щама (Фиг. 4).



А) *Б)* *В)* *Г)*

Фигура 4. Колонии от експерименталните щамове върху КДА на 10-ти ден от посева: А) QM9414, Б)M17, В)M27G и Г)M7

След 72/80-я час и при четирите щама се забелязва начало на конидиообразуването. Спорите се образуват по цялата повърхност на въздушния мицел, формиращ концентрични кръгове. Конидиоспорите са кръгообразни, с размери 3-4 μm.

1.3. Установяване степента на полиморфизъм между щамовете.

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) анализ на щамовете QM 9414, M27G, M7 и M17

Три от щамовете - M27G, M7 и M17 - използвани в настоящата дисертационна работа са получени в резултат на комбинация от UV и химичен мутагенез от един изходен щам (Atev et al., 1987). Като референтен щам е използван QM9414. С цел обща оценка на нивото на ДНК полиморфизъм в геномите на щамовете, е проведен SRAP анализ с общо 23 праймерни двойки (Табл. 2).

След PCR амплификация с посочените праймерни двойки, от геномна ДНК изолирана от изследваните щамове, големината на получените SRAP фрагменти е определена чрез капилярна електрофореза и сравнена с ДНК стандарти с известна големина. Получените резултати са използвани за сравнителен анализ на SRAP спектрите на анализираните четири щама. За всеки отделен SRAP фрагмент е отчетено присъствие или отсъствие в SRAP спектъра на всеки опитен щам. В резултата на сравнителния анализ отчетените SRAP фрагменти са разпределени в три групи: SRAP фрагменти присъстващи в спектрите на всички анализирани щамове, полиморфни SRAP фрагменти присъстващи в спектрите на част от анализираните щамове и специфични SRAP фрагменти, които присъстват само в спектъра на един щам. Резултатите от сравнителния SRAP анализ на четирите щама са сумирани в Таблица 2 и показват относително високи нива на ДНК полиморфизъм между пробите. Общият брой на амплифицирани различни по големина SRAP фрагменти за четирите проби е 828, като средния брой фрагменти за една праймерна двойка е 36. Съответно процента на полиморфни SRAP фрагменти варира между 46% и 94% от общия брой различни по големина SRAP фрагменти при отделните праймерни двойки, а средният процент на полиморфни SRAP фрагменти е 74%. Една значителна част от наблюдаваните полиморфни SRAP фрагменти са специфични и присъстват в SRAP спектъра само на един от щамовете, като средният брой на специфични SRAP фрагменти за използваните праймерни двойки е 40%, а при отделни праймерни двойки достига до 65% (Табл. 2).

Таблица 2. Резултати от SRAP анализа на щамове QM9414, M27G, M7 и M17. Полиморфни и специфични SRAP фрагменти получени след PCR амплификация с отделните праймерни двойки

Комбинация от праймери за амплифициране на SRAP фрагменти	***Общ брой амплифицирани SRAP фрагменти***	***Брой полиморфни* SRAP фрагменти***	***% полиморфни* SRAP фрагменти***	***Брой SRAP фрагменти специфични** за един щам***	***% SRAP фрагменти специфични** за един щам***
EM10 x ME2	40	28	70%	7	18%
EM10 x ME7	47	40	85%	27	57%
EM1 x ME10	22	15	68%	0	0%
EM1 x ME1	44	35	80%	23	52%
EM1 x ME5	30	21	70%	11	37%
EM2 x ME2	34	28	82%	14	41%
EM2 x ME7	28	24	86%	8	29%
EM3 x ME6	21	10	48%	6	29%
EM3 x ME9	42	23	55%	14	33%
EM4 x ME3	56	37	66%	27	48%
EM4 x ME6	47	38	81%	19	40%
EM4 x ME10	10	8	80%	3	30%
EM5 x ME10	24	11	46%	9	38%
EM5 x ME5	49	40	82%	28	57%
EM5 x ME8	34	31	91%	22	65%
EM6 x ME4	11	9	82%	0	0%
EM6 x ME6	79	62	78%	44	56%
EM7 x ME9	44	29	66%	11	25%
EM8 x ME1	19	14	74%	6	32%
EM8 x ME4	48	33	69%	13	27%
EM8 x ME8	21	14	67%	7	33%
EM9 x ME2	62	44	71%	22	35%
EM9 x ME9	16	15	94%	7	44%
ОБЩО	**828**	**609**	**74%**	**328**	**40%**

* полиморфни SRAP фрагменти, които не присъстват в SRAP профила на поне един от щамовете за посочената праймерна двойка

** специфични SRAP фрагменти, които присъстват в SRAP профила само на един от изследваните щамовете за посочената праймерна двойка

Въпреки, че SRAP маркерите се прилагат в различни изследвания повече от десетилетие, основната част от публикуваните досега резултати са свързани с характеризиране на колекции растителни генетични ресурси и растителни сегрегиращи популации (Robarts and Wolfe, 2014). Търсенето в достъпната научна литература, показа само три публикации за прилагане на SRAP маркери за анализ на генетичното разнообразие при гъби. *Ren et al.* (2012) използват SRAP маркери (24 праймерни двойки) за анализ на генетичното разнообразие при колекция от 20 щама ендофитни гъби изолирани от иглолистни растения от семейство Тисови, като получават средно по 24,3 SRAP фрагмента амплифицирани за една праймерна двойка, от които 76% са полиморфни. *Tang el al.* (2010) получава амплификация на средно по 14 SRAP фрагменти за праймерна двойка, при анализиране на 34 щама гъби *Auricularia auricula* с 11 праймерни двойки. Изследването показва високо ниво на полиморфизъм като повече от 96% от наблюдаваните фрагменти са полиморфни. В подобно изследване на колекция от 15 щама гъби *Pleurotus pulmonarius* с 20 праймерни двойки *Yin et al.* (2014) получават средно по 6,55 SRAP фрагменти за праймерна двойка, като 74,8% от получените SRAP фрагменти са полиморфни за изследваните проби.

Сравняването на получените резултати показва следните основни сходства и различия:

- При извършения SRAP анализ на четирите щама са отчетени по-голям среден брой SRAP фрагменти амплифицирани от една праймерна двойка (средно по 36 фрагмента), в сравнение с публикуваните резултати от посочените по-горе SRAP анализ на гъби (средно по 24,3, 14 и 6,55 SRAP фрагменти). Наблюдаваният по-висок среден брой SRAP фрагменти в проведения от нас анализ, вероятно се дължи на използвания метод на детекция (детекция на флуоресцентно белязани SRAP фрагменти разделени по големина след капилярна електрофореза), който е със значително по-висок праг на детекция и чувствителност от използваните в посочените по-горе изследвания, ползващи сребърно оцветяване на ДНК фрагментите, след електрофореза в акриламидни гелове.

- Проведеният от нас SRAP анализ, установява сходни нива на полиморфни SRAP фрагменти (средно 74% от наблюдаваните SRAP фрагменти показват полиморизъм след анализ на четирите изследвани проби) с тези от посочените по-горе изследвания (средно 76% полиморфни фрагменти при анализ на 20 щама, 96% при анализ на 34 щама и 74.8% при анализ на 15 щама).

- Въпреки че получените данни не предоставят информация за мутациите и разположението им в генома, в резултат на което се наблюдават полиморфни SRAP фрагменти, анализът може да бъде успешно използван за картиране на мутации, водещи до определен фенотип, когато е съчетан с получаване и характеризиране на полово потомство на изследваните мутантни щамове. Друг важен резултат от проведения SRAP анализ е, че една значителна част от наблюдаваните SRAP фрагменти са специфични и присъстват само в спектъра на един щам. Последното може ефективно да се използва за прилагането на SRAP анализа за определяне на щамова идентичност на микромицети и създаване и прилагане на методи за идентификация и качествен контрол.

Резултатите от SRAP анализа на изследваните щамове, са използвани и за оценка на генетичното сходството между тях, като е конструирана матрица, в която присъствието на определен SRAP фрагмент в спектъра е отбелязвано с ‘1’, а липсата на фрагмент е отбелязвано с ‘0’. Получената матрица сочи по-високо генетично сходство на щамовете M27G и M17, в сравнение с M7 и референтния щам QM9414.

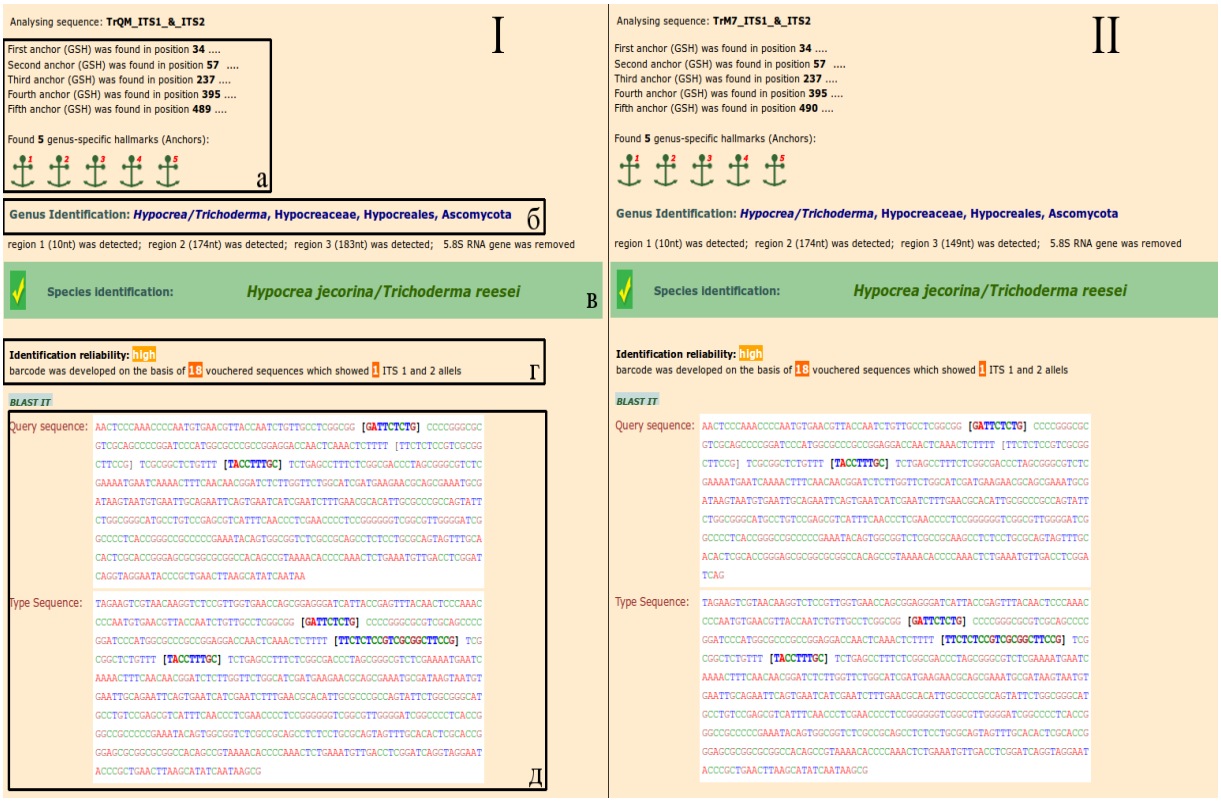
1.4. Потвърждаване видовата принадлежност на щамове QM9414 и M7 към вида Trichoderma reesei (Секвенционен анализ по ITS рибозомалните гени)

ITS анализа – установяващ принадлежността към вида *Trichoderma reesei,* е проведен с щамовете M7 – продуцента с най-високи целулазни активности и референтният биообект – QM9414.

Видовото определяне на организмите, отнасяни към р. *Trichoderma*, силно се затруднява от липсата на изразени диференциращи морфологични признаци между тях. Този факт прави резултатите между отделните изследвания трудно съпоставими поради вероятността от неправилно определяне на експерименталните видове. *Druzhinina et al.* (2005) предлагат молекулярен метод за разграничаване на видовете от този род, базиран на 5 нуклеотидни последователности (олигонуклеотидни баркодове), намиращи се във вътрешните транскрибируеми спейсери (ITS) 1 и 2 на рРНК. Резултатите от тяхното проучване са използвани за създаване на специализиран, уеб-базиран софтуер *(TrichOKey)* за определяне на представители на рода.

С цел потвърждаване на принадлежността на използваните в дисертационния труд щамове към *Trichoderma reesei,* ITS1 и ITS2 последователностите на референтния и мутантния щам са секвенирани по метода на Санджер (Sanger and Coulson, 1975). Секвенирането е осъществено в две повторения. Консенсусните секвенции са установени след анализ на суровите данни с помощта на софтуерен пакет BioEdit 7.1.9 (Hall, 1999). В резултат на този анализ за щама *Trichoderma reesei* QM9414 (TrQM9414) е получена консенсус последователност, състояща се от 586 b.p., а за мутантния щам *Trichoderma reesei* M7 (TrM7) тя е с дължина 552 b.p. Тези последователности са използвани като входяща информация за установяване на видовата принадлежност на двата щама с помощта на уеб-базираната база данни *TrichOKey.*

На фигура 5 са представени резултатите от молекулярната идентификация на изследваните щамове. В горната част на фигурата са описани началните позиции на детектираните олигонуклеотидни баркодове за всяка от секвенциите. Текстът, маркиран в зеленото каре, съобщава видовия произход на секвенцията, а под него - надеждността на получените резулта



Фигура 5. Резултати от генетичната идентификация на изследваните щамове, направена на базата на ITS1 и ITS2 - I) TrQM; II) TrM7 а) начални позиции на детектираните олигонуклеотидни баркодове; б) таксономични данни за организма, от който произхожа изследваната последователност; в) видова принадлежност на микроорганизма, от който произхожда изследваната последователност; г) оценка за надеждността на получените резултати и обосновка за оценката; д) изследвана (горе) и референтна последователност (долу).

Както се вижда от фигура 5, референтният (I) и мутантният щам (II) се отнасят към *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) с висока степен на надеждност.

1.5. Физиолого-биохимична характеристика на щам Trichoderma reesei M7

Асимилация на някои въглеродни и азотни източници от щам T. reesei M7

Установяването, че щам М7 е с най-високи целулазни активности, показва висока степен на полиморфизъм и доказано принадлежи към вида *Trichoderma reesei*, е причината, поради която експерименталната работа в настоящия дисертационен материал е продължена с използването на този продуцент.

От своя страна изследването на основните асимилационни възможности на продуцента, дава отправна представа за качественото влияние на хранителните компоненти върху развитието на щама.

Асимилационните характеристики на микромицетите до голяма степен са предопределени от хидролитичния им профил. Планетарното разпространение на видовете от род *Trichoderma* предполага широк биосинтетичен потенциал, даващ им възможност успешно да усвояват различни въглеродни и азотни източници. Всяко оптимално, контролирано култивиране на даден биообект се предшества от установяване на асимилационните му възможности (Monga, 2001; Lalitha et al., 2012).

Като въглероден източник щам М7 може да усвоява както моно- и дизахариди, така и полизахариди. Щамът има много добър растеж върху глюкоза, целобиоза, малтоза, асимилира лактоза, захароза и фруктоза, слабо - галактоза. Не е изненадващ растежът на биообекта върху двете форми на целулоза, които са използвани – Na-КМЦ и Авицел (Табл. 3).

Таблица 3. Асимилация на въглеродни и азотни източници от щам Trichoderma. reesei M7

Вид на въглеродния източник	***Асимилационни способности***	***Вид на азотния източник***	***Асимилационни способности***
Глюкоза	асимилира	KNO_3	не асимилира
Авицел	асимилира	$NaNO_3$	не асимилира
Na-КМС	асимилира	NH_4Cl	асимилира
Фруктоза	асимилира	$(NH4)_2SO_4$	асимилира
Лактоза	асимилира	Урея	асимилира
Ксилан	асимилира	Пептон	асимилира
Галактоза	слабо асимилира	Аспаргинова киселина	асимилира
Манан	асимилира	Глутаминова киселина	асимилира
Малтоза	асимилира	-	-
Захароза	асимилира	-	-
Целобиоза	асимилира	-	-
Етанол	не асимилира	-	-
Метанол	не асимилира	-	-
Лимонена киселина	не асимилира	-	-
Оксалова киселина	не асимилира	-	-

Азотният източник, като вид и като съотношение спрямо въглеродния компонент в средата, е от съществено значение за контрола и „насочването“ на биосинтетичните пътища на продуцентите. Знае се, че плесените асимилират както органични, така и неорганични форми на азот. От използваните азотни източници (Табл. 3) интерес представлява отсъствието на растеж на щама върху нитрати.

2.Оптимизиране състава на агаризираните, посевните и ферментационните хранителни среди за култивиране на щам T. reesei **M7**

Повечето усилия на експериментаторите са насочени към оптимизация в качествения и количествен състав на ферментационните среди, водещ до максимален целулазен синтез. По-малко внимание се обръща на средите използвани за поддържане на щамовете и тези за получаване на биомаса. В изследванията ни отделяме специално внимание именно на тези хранителни среди, като освен това разглеждаме ефекта върху целулазната синтеза на някои въглехидрати, добавени в минимални количества. Използваме същите въглехидрати и за осъществяването на същинска целулазна ферментация – целта е установяване специфичното влияние, което тези прости захари (част, от които се явяват и продукт на ензимното действие), оказват върху биосинтетичната изява на продуцента.

Синтезата на целулазни ензими в описаните експерименти минава през три основни етапа:

1. Получаване на споров материал върху агаризирани среди.
2. Натрупване на биомаса (инокулум) в дълбочинни условия, върху лесно усвояем въглероден източник.

3. Същинска ферментация (синтез на целулазни ензими), с използването на кристална целулоза като индуциращ субстрат.

Поддържането на щама върху КДА, получаването на вегетативен материал върху глюкоза и ферментационен процес върху кристална целулоза е контролният стандарт, спрямо който сравняваме всички вариации на компонентите в средата. В по-нататъшните изследвания е използван щам *T.reesei* M7 - продуцентът с установени най-високи целулазни активности.

Представянето на повечето опитни постановки се усложнява и от необходимостта влиянието на променливите компоненти да се разглежда за всеки отделен етап от култивирането на щама, т.е. за изясняване ефекта на съответната променлива върху първия етап от култивирането (получаване на споров материал върху среди за поддържане), трябва да бъде проведен цялостен ферментационен процес (до трети етап включително) и последващо отчитане на синтезата на целулолитични ензими. Същото касае проследяване влиянието на даден компонент върху втория етап (получаване на инокулум). Това изискване е спазено в настоящата глава, с оглед прецизността на опитните постановки и коректността на изнесените данни.

На фигура 6 е дадена технологичната схема на извършените проучвания.

Фигура 6. Схема на проведените експерименти в глава 2.

2.1. Влияние на въглеродния източник в агаризираните хранителни среди за поддържане на щама върху целулазната биосинтеза

Поддържането на работните щамове е важен технологичен етап в биотехнологичните производства. Използването на подходящи среди за поддържане на щамовете може да селектира, с което да повиши продуктивността на биообектите. В направените изследвания

варираме вида на въглеродния компонент в средата. В избора на варианти се ръководихме от това въглеродния източник да е или продукт на целулазната хидролиза (глюкоза, целобиоза), или да е форма на целулозата т.е. ензимен субстрат (Авицел, Na-КМЦ), или да е индуктор на целулазното действие (лактоза). От друга страна, картофено-декстрозният агар (КДА) е универсално приложим за съхранение и получаване на споров материал от род *Trichoderma,* поради което контролното му място в проучванията бе задължително.

Опитните среди съдържат по 2% агар и по 2% съответно: глюкоза, целобиоза, Авицел, Na-Карбокси Метил Целулоза (Na-КМЦ) и лактоза. Всяка от гореописаните среди е със солеви състав на Манделс. Картофено-декстрозният агар е с 2% стандартизирано агарово съдържание.

Изследванията на целулазната активност са извършени след трикратно препосяване от единична колония на подбрания експериментален щам – М7, върху изброените опитни среди.

Скоростта на мицелния растеж е отчетена с измерване растежа на единична колония от щама, посята върху опитна агаризирана среда в петри с диаметър 90 mm. На таблица 4 е представен растежа на продуцента в mm, за шест денонощия.

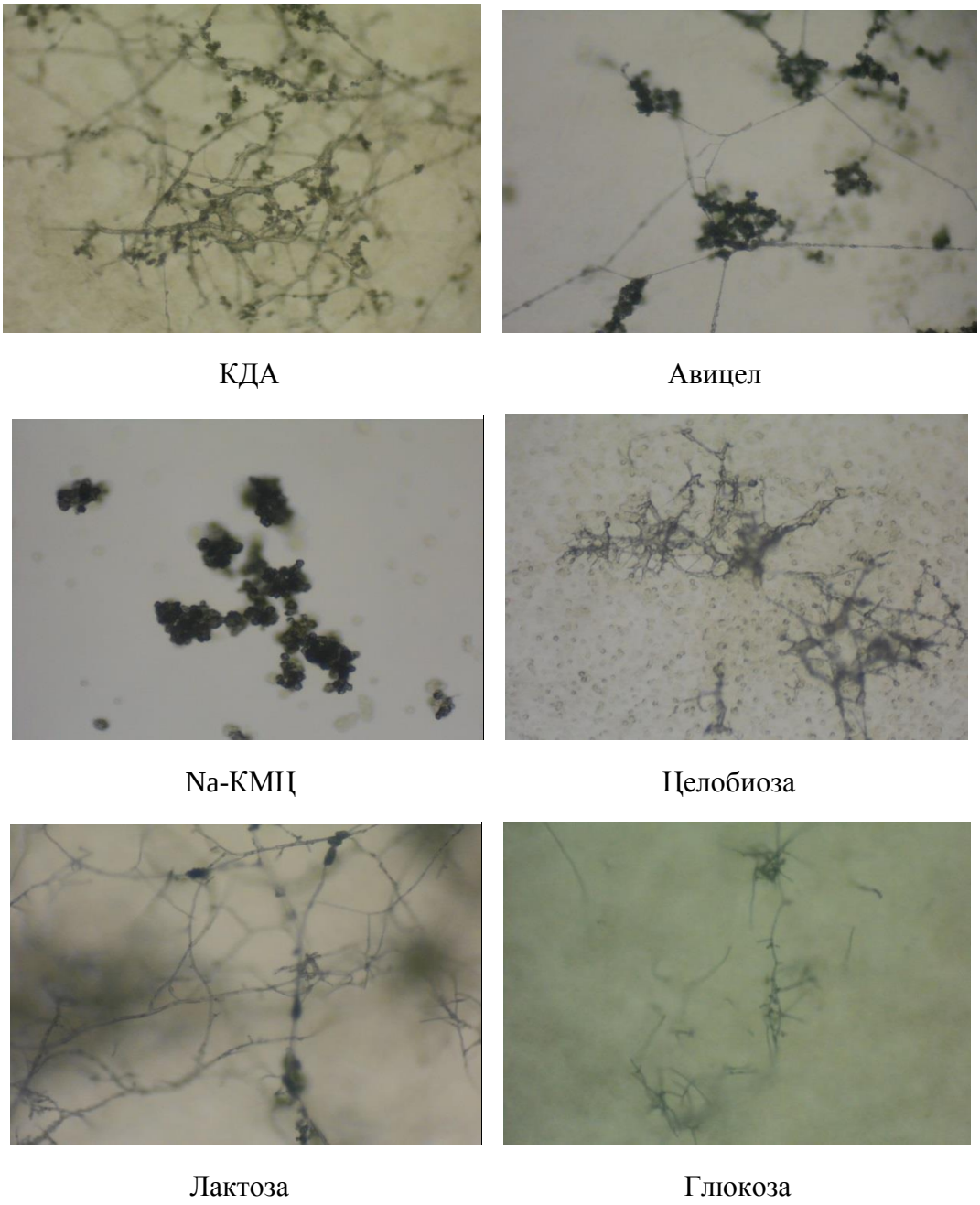
Таблица 4. Мицелен растеж на Trichoderma reesei M7 в mm

Среди за поддържане	*Растеж на мицела [mm]*					
	Време [d]					
	1	2	3	4	5	6
КДА	20	40	90	-	-	-
Авицел	-	10	35	55	75	90
Na-КМЦ	-	7	35	55	75	90
Целобиоза	15	30	70	90	-	-
Лактоза	15	30	70	90	-	-
Глюкоза	10	20	55	75	90	-

Забелязва се, че при култивиране на щама върху КДА, субстратният мицел покрива цялата агарова повърхност на 3-я ден от посева. Оцветяването на агара е с характерния за вида наситен жълто-оранжев цвят. Върху лактоза и целобиоза биообектът покрива агаровата повърхност на петриевата паничка за 4 денонощия, а върху глюкоза - за 5 денонощия. Най-бавен е растежът на продуцента върху Авицел и КМЦ – необходими са 6 денонощия за разпростиране на мицела върху средата.

Прави впечатление отсъствието на оранжево агарово оцветяване при всички опитни варианти. И ако върху целобиоза, микрокристална целулоза и лактоза се вижда отделянето на жълт пигмент в началото на растежа, върху Na-КМЦ и глюкоза то напълно липсва.

На фигура 7 е представено спорулирането на продуцента след 10 дневно термостатиране.



Фигура 7. Развитие на T. reesei M7 върху агаризирани хранителни среди с различни С-източници

Ясно забележими са различията в гъстотата на въздушния мицел при прорастването на микромицета на различните среди. Щамът добре развива въздушния си мицел върху КДА и по-слабо върху другите използвани среди.

За изследване ефекта на поддържащите хранителни среди върху целулазната активност, беше необходимо осъществяването на всички последващи етапи от култивационния процес. Извършихме посев от спорова суспензия (2.10^6 CFU/ml) в среда за получаване на вегетативен материал. След което – за 24 часа – протече вегетативното намножаване на щама. От получения вегетативен материал 20% използвахме за посев на ферментационна хранителна среда

(съдържаща 2% Авицел). След осъществяване на ферментационния процес отчетохме ендоглюканазна, FPA и β-глюкозидазна активности, както и освободения екзоклетъчен протеин на 120-я час от култивирането на щама. Резултатите са представени на таблица 5.

Таблица 5. Ендоглюканазна, FPA и β-глюкозидазна активности на 120-я час от култивирането на биообекта

Въглероден компонент в агаризираните среди	*Ендоглюканазна активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкозидазна активност [IU/ml]*	*Общ протеин [mg/ml]*
КДА	30,4	3,79	1,51	2,11
Авицел	35,2	4,31	1,65	1,96
Na-КМЦ	28,1	3,17	1,17	2,05
Целобиоза	27,4	2,88	0,98	1,99
Лактоза	25,9	2,47	1,29	1,87
Глюкоза	23,2	4,53	1,13	1,94

Вариантът, при който продуцентът е поддържан върху Авицел, дава повишаване в трите измерени активности (спрямо полученото при поддържане върху КДА), като нарастването е съответно: 15,8% за ендоглюканазната, 13,7% за FPA и 9,3% за β-глюкозидазната. Намаляване на биосинтетичния потенциал на щама се наблюдава при всички останали агаризирани варианти. Най-чувствително понижаване на ендоглюканазната активност се наблюдава при препосяване върху глюкоза, а най-ниска β-глюкозидазна активност се отчита при поддържане на щама върху целобиоза. Второто буди интерес имайки се предвид, че именно целобиозата е субстратът на β-глюкозидазното действие, което опровергава предположенията, че увеличаването на синтезата на β-глюкозидаза, може да се индуцира чрез добавяне на целобиоза в поддържащата хранителна среда. Интерес представляват и ниските целулазни активности, които се отчитат при съхранение на щама върху лактозата като въглероден компонент в средата. По литературни данни (Harikrishna et al., 2000; Muthuvelayudham et al., 2005, 2006) лактозата е широко използвана като индуктор на целулазната биосинтеза, докато от таблица 5 се вижда понижаване в целулолитичните активности при поддържане на продуцента върху лактоза. Получените по-ниски резултати при поддържане на щама върху лактоза и целобиоза, може да се дължат на потискане експресията на екзоклетъчни целулази, във ферментационни условия. Още повече (Табл. 4), че растежът на щама върху лактоза и целобиоза е интензивен, с добро развитие на субстратен и въздушен мицел.

Изборът на глюкоза като въглероден източник в агаризираната хранителна среда, е с цел проучване на нейния ефект върху β-глюкозидазната активност (β-глюкозидазата е едва 1% от целулазния комплекс на *T. reesei*). Както обаче се забелязва от таблицата, ендоглюканазната и β-глюкозидазната активности падат, докато FPA-целобиохидролазната е с 19,5% по-висока от полученото при КДА-контролния вариант. Така, че поддържането върху глюкоза може да се използва за по-високи нива на синтеза на СВН, катализиращи хидролизата на целулозосъдържащите субстрати по екзо-механизъм, с освобождаването на целобиоза като краен продукт.

Данните, получени от разтворимата форма на целулозата (Na-КМЦ), използвана като въглероден компонент, показват понижаване в целулазната активност спрямо КДА-контролния вариант, въпреки че то е по-незначително в сравнение с другите използвани агаризирани среди (разбира се, с изключение отчетеното за Авицел).

Обобщено може да се каже, че микрокристалната целулоза, не само е основният индуциращ субстрат за целулазната биосинтеза, но и въглеродния източник, върху който биообектът би се съхранявал най-оптимално, с цел максимална изява на целулазния му потенциал.

2.2. Влияние на въглеродния компонент в посевната хранителна среда върху натрупването на биомаса и синтеза на целулази

Оптималното дълбочинни култивиране на *Trichoderma reesei* за получаване на целулазни ензими е двуетапен процес (Атев, 2005). В първия етап за 24 часа, върху лесно усвоим С-източник (2% глюкоза) се натрупва вегетативен материал. Вторият етап включва същинския ферментационен процес, при който се синтезират биопродуктите, върху кристална целулоза (Авицел - 2%), с 20%-ен посев от инокулума.

В проведените експерименти за получаване на вегетативен материал освен глюкоза, са използвани следните моно- и дизахариди в концентрация от 2%: лактоза, малтоза, целобиоза, фруктоза, захароза, галактоза.

На таблица 6 е представено количеството синтезирана биомаса, отчетено след довеждането й до абсолютно сухо тегло, а на фигура 8 е даден снимков материал на получената биомаса след 24 часовото култивиране на продуцента.

Таблица 6. Натрупано количество биомаса (mg/ml) в експерименталните посевни среди

Въглероден източник	Глюкоза	Целобиоза	Малтоза	Фруктоза	Лактоза	Захароза	Галактоза
АСБ (mg/ml)	$3,93_{\pm 0,24}$	$3,88_{\pm 0,18}$	$3,94_{\pm 0,38}$	$3,33_{\pm 0,17}$	$1,63_{\pm 0,19}$	$1,73_{\pm 0,21}$	$0,76_{\pm 0,11}$

Фигура 8. Визуализация на синтезираната биомаса от щама

От таблица 6 се вижда, че максималното количество биомаса синтезирано на глюкоза, целобиоза и малтоза е приблизително еднакво, докато растежът на продуцента е по-слаб с около 50% върху лактоза и захароза. Количеството биомаса, синтезирано от щама върху галактоза, е приблизително четири пъти по-малко от отчетения максимален растеж. Продуцентът много добре усвоява и фруктоза.

Доброто усвояване на целобиоза, е вероятната причина за ниския добив на екстрацелуларна β-глюкозидаза при ферментация на биопродуцента върху целулоза (значим недостатък на индустриалните *Trichoderma* щамове), за сметка на интрацелуларната, която

катализира хидролизата до глюкоза (доказано в глава 2.3.), водещо до значително натрупване на биомаса.

След като вегетативният посевен материал върху различните въглеродни източници беше получен, експериментът продължи с 20% посев във ферментационна хранителна среда и проведено култивиране. Максимална синтеза на целулолитични ензими е отчетена на 120-я час от ферментацията, а на таблица 7 са представени стойностите на ендоглюканазната, FPA и β-глюкозидазната активности на същия час.

Таблица 7. Влияние на въглеродния компонент в посевната хранителна среда върху синтезата на целулазни ензими

Вид на С-източника за синтеза на вегет. посевен материал	*Ендоглюканазна активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкозидазна активност [IU/ml]*	*Общ протеин [mg/ml]*
Глюкоза	30,4	3,79	1,51	2,11
Лактоза	31,8	2,11	1,34	1,94
Целобиоза	28,3	2,43	1,09	2.02
Малтоза	29,5	3,23	1,17	2,14
Фруктоза	28,1	3,44	1,24	2,07
Захароза	27,5	3,23	1,14	1,98
Галактоза	24,8	3,19	1,23	1,93

В случая, вариантът с глюкоза представлява контролен вариант, спрямо който сравняваме всички вариации на компонентите в средата.

От резултатите на таблица 7 прави впечатление, че въпреки двукратно по-малкото количество биомаса, синтезирано върху лактоза, синтезата на ендоглюканаза, осъществена именно с така получената биомаса, е най-висока (31,8 IU/ml). От друга страна - FPA и β-глюкозидазните активности са по-ниски не само при вегетативния материал, получен върху лактоза, но и при използваните други опитни захари (сравнено с контролния вариант – глюкоза).

Въпреки голямото количество биомаса, натрупано върху целобиоза (идентично с това върху глюкоза), измерените целулазни активности са значително по-ниски от контролата, като това е особено изразено за β-глюкозидазата, при която понижението е 27,8%.

Подобни са резултатите и за малтозата – друг въглехидрат, върху който продуцентът натрупва значимо количество биомаса.

Галактозата, при която натрупването на биомаса е най-слабо (над 4-ри пъти по-ниско от това на глюкоза), синтезата на целулазни ензими остава непропорционално висока, (въпреки 4-кратно по-малкото количество биомаса, с която е осъществен посева), т.е. не се наблюдава линейна зависимост между посевната биомаса и синтезата на целулази.

Прави впечатление, че вегетативният материал, получен върху варианта с лактоза, освен че дава най-високата ендоглюканазна активност (31,8 IU/ml), показва и най-ниска FP активност (2,11 FPU/ml). При използването на галактоза EG-активността е 24,8 IU/ml – най-нисък отчетен резултат, но FPA е 3,19 FPU/ml, значително по-висока активност от тази измерена при лактозата.

От казаното до сега могат да бъдат направени две констатации, а именно:

1. Количеството биомаса, с която се извършва периодичното ферментационно култивиране за синтеза на целулази не е от съществено значение, особено (както е в нашия случай), ако за индуциращ субстрат се използва кристална (неразтворима) целулоза.

2. Полученият върху различни въглехидрати вегетативен материал, дава различно съотношение на синтезираните от продуцента целулазни ензими, при последващото му култивиране върху целулоза.

2.3. Култивиране на T. reesei M7 върху някои безцелулозни субстрати и проследяване синтезата на целулазни ензими

Приема се, че водещият индуциращ субстрат за синтеза на целулазни ензими е целулозата (Mandels 1975; Ahamed et al., 2008). Освен това, практическото приложение на целулазите често е свързано с утилизация на целулозосъдържащи материали. От друга страна в литературата присъстват данни за синтеза на целулазни ензими върху въглеродни източници с нецелулолозен състав като лактоза и софороза (Mandels 1975; Chaudhuri et al., 1993; Morikawa et al., 1995; Ahamed et al., 2008).

Проведеният експеримент е осъществен като вместо кристална целулоза (Авицел), ферментационната среда съдържа лактоза, целобиоза, глюкоза и малтоза. Причината да бъде избрана целобиозата е, че този дизахарид от една страна е основен структурен елемент на целулозата, от друга – субстрат за действието на ензима β-глюкозидаза. Глюкозата и малтозата се усвояват много добре от щама, растежът на микромицета е бърз, а натрупаното количество биомаса – значително. Целобиозата и глюкозата са и крайни продукти на целулазното ензимно действие. В този контекст интерес представлява степента на инхибиране, което двата въглехидрата биха оказали върху целулазния синтез, при това проследявайки върху коя ензимна активност, инхибирането ще е по-изразено. Освен това, така може да се установи дали щамът конститутивно синтезира целулази и как (ако е така) това се повлиява от въглеродния компонент в средата.

Лактозата често се споменава в литературата, било като индуктор (Muthuvelayudham et al., 2006; Ahamed et al., 2008) (гл. 2.4.), било като основен субстрат за целулазна биосинтеза (Chaudhuri et al., 1993; Bailey et al., 2003; Ahamed et al., 2008). Пазарната й цена е ниска, което я прави подходящ субстрат за крупно мащабно приложение.

Ферментационният процес е проведен за 6 денонощия, при условия идентични с тези за култивиране на щама върху кристална целулоза. Количеството на добавените като въглероден компонент захари, както и това на микрокристалната целулоза е 2%. Резултатите са сравнени с тези целулазни активности, получени върху Авицел (на 120-я час от началото на ферментацията) (Табл. 8).

Таблица 8. Целулазни активности, общ белтък и pH на 120-я час от култивирането на щам T. reesei M7 върху различни въглеродни източници

Въглероден компонент във ферментацион-ната среда (2%)	*Ендоглюканазна активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкозидазна активност [IU/ml]*	*Общ разтворим белтък [mg/ml]*	*pH*
Авицел	30,4	3,79	1,51	2,11	2,9
Лактоза	13,9	1,84	0,14	1,68	2,6
Целобиоза	3,2	3,65	0,13	1,92	2,6
Глюкоза	4,6	1,44	-	2,09	2,3
Малтоза	2,4	0,31	-	1,08	2,4

От таблица 8 се вижда, че върху всички изследвани въглеродни източници синтезата на целулолитични ензими от щама е значително по-ниска от тази върху Авицел. Екзоклетъчната β-глюкозидаза почти изцяло отсъства като част от измерените целулазни активности, което е напълно обяснимо при използването на монозахари (глюкоза и малтоза), но не толкова при използването на целобиоза и лактоза. Ендоглюканазната активност е пъти по-ниска от отчетеното върху Авицел. При използването на лактоза тя е 13,9 IU/ml, а при останалите три експериментални захари не достига до 5 IU/ml.

Прави впечатление сравнително високата FP активност, която се наблюдава при култивиране на щама върху целобиоза – 3,65 IU/ml, резултат сравним с контролния (3,79 IU/ml) на същия час. pH на културалната течност (120-ти час) както за контролния, така и за опитните варианти, е в киселата област (от 2,3 до 2,9). Екстрацелуларният белтък, отнесен към измерените целулазни активности, е сравнително висок. Отчетеният разтворим протеин, синтезиран върху целобиоза и глюкоза е идентичен с този, освободен от щама върху кристална целулоза.

На фигура 9 са представени специфичните ендоглюканазна, FP и β-глюкозидазна активности на 120-я час от началото на ферментационния процес. Очаквано, най-висока специфична EG-активност има върху кристална целулоза (14, 4 U/mg). Трябва да се отбележи, че върху лактоза специфичната EG-активност е 8,3 U/mg, което е с 42,3% по-малко от същата върху Авицел.

А)

Б)

В)

Фигура 9. Специфични ендоглюканазна (А), FPA (Б) и β-глюкозидазна (В) активности, изчислени след проведена ферментация на щама върху безцелулозен субстрат (120-ти час)

Специфичната β-глюкозидазна активност във всички опитни варианти е пренебрежимо ниска, като при използването на глюкоза и малтоза тя отсъства (поради отсъствието на екстрацелуларна β-глюкозидаза).

Специфичните FP-активности на опитните варианти са относително високи, като върху целобиоза отчетената специфична FP-активност е с 6% по-висока от контролния вариант. Това е доказателство, че върху различни въглеродни компоненти се индуцира различна синтеза на индивидуални целулазни ензими. Проучванията в тази област могат да доведат до оптимизиране състава на хранителните среди, с оглед конкретното практическо приложение на целулозоразграждащия комплекс.

2.4. Проследяване ефекта на моно- и дизахариди - добавени като индуктори - върху целулазната активност на продуцентите

В представеното изследване (подобно на глава 2.3.) експериментът е осъществен с използването на глюкоза, целобиоза, лактоза и малтоза. Моно- и дизахаридите са употребени в минимални количества (0,1%), прибавени към класическия (контролен) субстрат за синтеза на целулази – кристална целулоза (Авицел-2%). Изброените въглехидрати са добавени: а) в началото на ферментационния процес (0h) и б) на четиридесет и осмия час от началото на ферментацията (48h). Причината да се избере вариант а) е значителното количество биомаса, което щамът натрупва върху споменатите захари. Докато вариант б) е избран, защото интензивна синтеза на целулази върху Авицел се наблюдава от 72-я час на култивирането. По този начин ефектът на добавените въглехидрати е разглеждан двояко: от една страна експериментът е насочен към установяване на тяхното индуциращо или инхибиращо влияние върху синтеза на целулазни ензими от щама, от друга се търси отговор на въпроса - има ли зависимост между вида на моно/дизахаридите и периода от ферментационния процес, при който биват добавени.

Експериментът е проведен с отчитане на шест хидролазни активности (ендоглюканазна, FPA, β-глюкозидазна, ендоксиланазна, ламинариназна и лихеназна), както и общия екстрацелуларен белтък (Табл. 9 и 11). Изчислени са и специфичните ензимни активности, както в случаите на добавяне на захарите в 0 час, така и когато въглехидратът е внесен на 48-я час от началото на процеса (Табл. 10 и 12). Данните отразяват биосинтетичната експресия на *T. reesei* M7 на 120-я час от култивирането.

Таблица 9. Биосинтеза на хидролазни ензими след добавяне на индуктор (0,1%) в началото на ферментационното култивиране (0h)

Вид индуктор добавен в 0h	*Ендоглюка-назна активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкоз. активност [IU/ml]*	*Ендоксила-назна активност [IU/ml]*	*Ламинари - назна активност [IU/ml]*	*Лихеназна активност [IU/ml]*	*Общ разтворим белтък [mg/ml]*
Контрола (Авицел)	30,4	3,79	1,51	5,62	0,291	0,131	2,11
Авиц.+Лактоза	33,2	2,44	1,42	5,30	0,284	0,144	1,98
Авиц.+ Целобиоза	26,3	2,07	1,11	5,09	0,261	0,113	2,01
Авиц.+ Глюкоза	20,2	4,20	1,27	4,88	0,262	0,157	1,73
Авиц.+Малтоза	29,2	3,57	1,22	5,02	0,239	0,106	1,86

Таблица 10. Специфични хидролазни активности след добавяне на индуктор (0,1%) в началото на ферментацията (0h)

Вид добавен индуктор (0h)	*Специфична ендоглюканазна активност [U/mg]*	*Специфична FPA [FPU/mg]*	*Специфична β-глюкозид. активност [U/mg]*	*Специфична ендоксила-назна активност [U/mg]*	*Специфична ламинари - назна активност [U/mg]*	*Специфична лихеназна активност [U/mg]*
Контрола (Авицел)	14,4	1,80	0.72	2,66	0,138	0,062
Авиц.+Лактоза	16,8	1,23	0,72	2,68	0,143	0,072
Авиц.+ Целобиоза	13,1	1,02	0,55	2,53	0,130	0,056
Авиц.+ Глюкоза	11,7	2,43	0,73	2,82	0,151	0,090
Авиц.+Малтоза	15,7	1,92	0,66	2,70	0,128	0,057

Таблица 11. Биосинтеза на хидролазни ензими след добавяне на индуктор (0,1%) на 48-я час от началото на ферментацията

Вид индуктор добавен в 48h	*Ендоглюка назна активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкоз. активност [IU/ml]*	*Ендоксила-назна активност [IU/ml]*	*Ламинари - назна активност [IU/ml]*	*Лихеназна активност [IU/ml]*	*Общ разтворим белтък [mg/ml]*
Контрола (Авицел)	30,4	3,79	1,51	5,62	0,291	0,131	2,11
Авиц.+Лактоза	29,2	2,19	1,28	5,10	0,221	0,070	1,68
Авиц.+ Целобиоза	25,1	2,58	1,29	5,22	0,251	0,119	1,92
Авиц.+ Глюкоза	25	3,93	1,02	3,19	0,274	0,114	1,70
Авиц.+Малтоза	30,1	3,96	1,48	4,61	0,221	0,103	1,96

Таблица 12. Специфични хидролазни активности след добавяне на индуктор (0,1%) на 48-я час от началото на ферментационния процес (48h)

Вид добавен индуктор (48h)	*Специфична ендоглюка-назна активност [U/mg]*	*Специфична FPA [FPU/mg]*	*Специфична β-глюкозид. активност [U/mg]*	*Специфична ендоксила-назна активност [U/mg]*	*Специфична ламинари - назна активност [U/mg]*	*Специфична лихеназна активност [U/mg]*
Контрола (Авицел)	14,4	1,80	0.72	2,66	0,138	0,062
Авиц.+Лактоза	17,4	1,30	0,76	3,03	0,132	0.042
Авиц.+ Целобиоза	13,1	1,34	0,67	2,72	0,131	0,062
Авиц.+ Глюкоза	14,7	2,31	0,60	1,88	0,161	0,067
Авиц.+Малтоза	15,4	2,02	0,76	2,35	0,113	0,053

Въз основа на представените данни могат да се направят следните заключения:

- Лактозата, добавена преди започване на ферментацията (0h), повишава EG-активността с 9,2% спрямо контролата. Глюкозата (0h) води до нарастване на FP-активността с 10,8 %.

- След добавяне на лактоза в средата нараства специфичната ендоглюканазна активност с 16,7% (0h) и 20,8% (48h), което показва синтезата приоритетно на този ензим от щама, вследствие лактозната индукция.

- Внасянето на четирите въглехидрата в концентрация 0,1%, без значение от часа на добавяне, понижава освободения екзоклетъчен белтък.

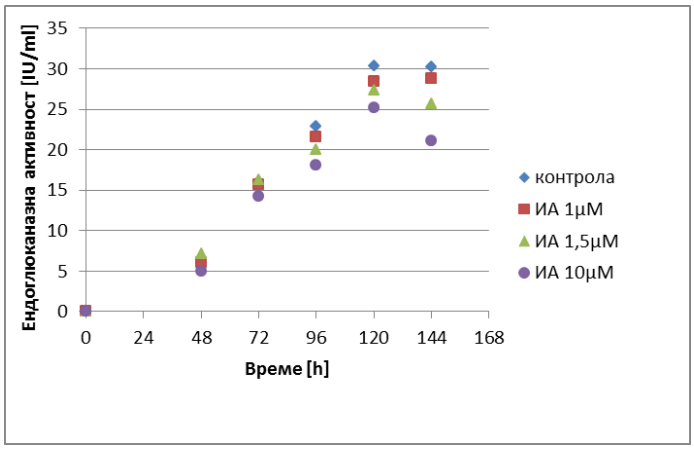
- В случаите, при които е измерено по-отчетливо повишение на целулазните активности, то е след добавяне на моно- и дизахаридите в 0-я час, т.е., преди започване на култивирането.

3. Проучване ефекта на растителни растежни регулатори върху биосинтетичния потенциал на T. reesei M7

В представените експерименти е проучен ефектът на изопентенил аденин и индолил оцетна киселина върху ендоглюканазната активност на *Trichoderma reesei* M7.

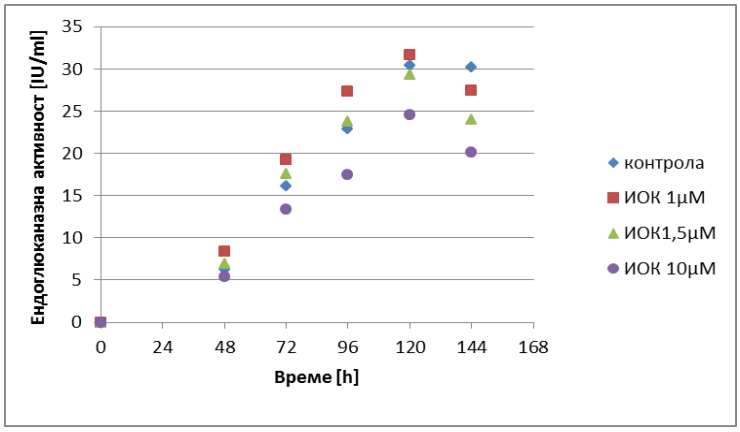
Влиянието на Изопентенил Аденина (ИА, цитокинин, прекурсор на Зеатина) и Индолил Оцетната Киселина (ИОК, ауксин) (поотделно и в комбинация), върху водещата ендоглюканазната активност е отчетено през 24 часа, от 48-я до 144-я час от ферментационното култивиране.

На фигура 10 е изразен ефектът на изопентенил аденина върху EG-активността, след добавянето на цитокинина поотделно, в три концентрации – 1, 1,5 и 10 µM. Резултатите на фигура 10 показват тенденция за намаляване на ендоглюканазната активност с нарастване добавените концентрации на ИА във ферментационната среда. Инхибиращият ефект и на трите използвани цитокининови концентрации, върху синтезата на ендоглюканаза от щама, е по-забележим в по-късните часове от дълбочинното култивиране.



Фигура 10. Влияние на изопентенил аденин върху ендоглюканазната продукция на щам Trichoderma reesei M7

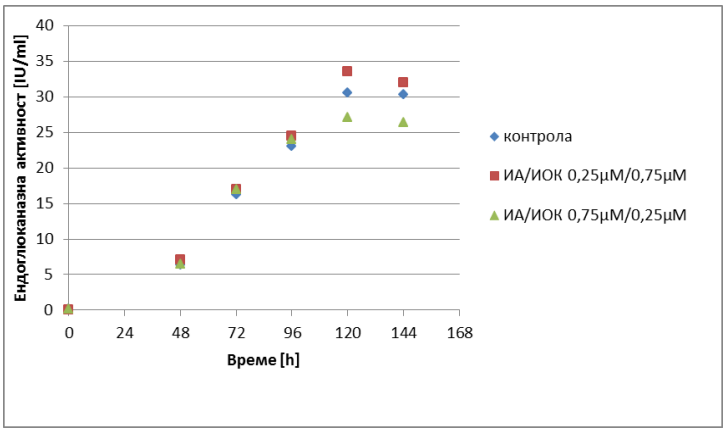
Изследванията продължиха с проучване влиянието на индолил оцетна киселина върху синтезата на ендоглюканаза (Фиг. 11). Самостоятелното действие на ИОК е проучено след добавяне на растителния регулатор към ферментационната среда, в три концентрации: 1, 1,5 и 10 µM. Концентрациите на ауксина, както и часовете на отчитане на EG-активността са същите като при проведения експеримент със самостоятелно използване на изопентенил аденина.



Фигура 11. Ефект на индолил оцетна киселина върху ендоглюканазната активност на продуцента

От фигура 11 се вижда, че подобно на изопентенил аденина и при ИОК с нарастването на приложената концентрация, измерената EG-активност на опитните варианти, спрямо контролата – пада. За разлика обаче от цитокинина, чийто ефект е изцяло инхибиращ, ауксинът, добавен в по-ниски концентрации (1 и 1,5 μM) повишава ендоглюканазата, измерена в часовете по-близо до началото на ферментационния процес (48-я - 96-я час). Максимално увеличение на активността спрямо контролата е отчетено на 96-я час - 19,2% след добавяне на 1 μM концентрация на ИОК. Прави впечатление, че в последните ферментационни часове (120-я и особено 144-я час) EG-активността на опитните варианти значително се понижава, което говори не просто за влияние на растителните растежни регулатори върху целулазната експресия, но и за специфичен времеви отговор, даван от микромицета на това фитохормонално въздействие.

Доказаното комбинирано влияние на цитокинините и ауксините в растителния организъм (Skoog and Miller, 1957), предполага техният ефект да не се разглежда индивидуално и върху синтезата на целулази от микромицета. Това наложи извършването на експерименти, отчитащи съвместното действие на растежните хормони върху ендоглюканазната продукция на щама. Съвместното действие на изопентенил аденина и индолил оцетната киселина е проучено в комбинация: 0,25 μM ИА към 0,75 μM ИОК (1:3) и 0,75 μM ИА към 0,25 μM ИОК (3:1) Отново е разгледана синтезата на ендоглюканаза от 48-я до 144-я час. На фигура 12 са представени резултатите.

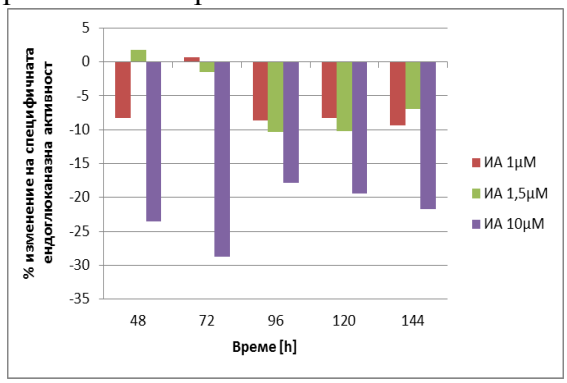


Фигура 12. Комбиниран цитокинин-ауксинов ефект върху ендоглюканазната продукция на щам T. reesei M7

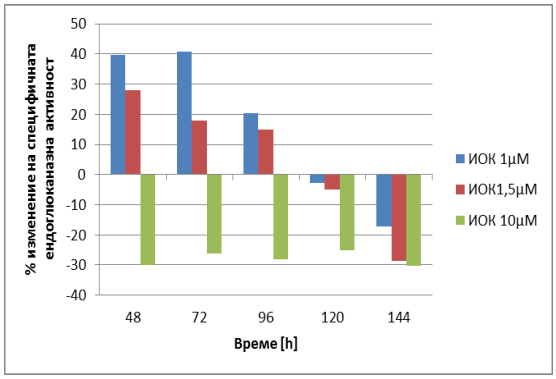
От представените данни се вижда, че положителното влияние върху ендоглюканазната активност на ИОК се потвърждава, когато в приложената комбинация ауксинът преобладава (цитокинин 0,25 μM – ауксин 0,75 μM). От друга страна по-скоро инхибиращият ефект на цитокинина (при самостоятелната му употреба) се установява и в случая, когато се изследва комбинираното влияние на двата фитохормона с преобладаващо цитокининово присъствие (цитокинин 0,75 μM – ауксин 0,25 μM).

Вариантът, при който съчетанието ИА-ИОК е в съотношение 1 към 3, показва максимално повишение на ендоглюканазната активност спрямо контролата на 96-я и 120-я час, като на 96-я час то се изразява със 7% нарастване, а на 120-я с 10,2%. За разлика от самостоятелното използване на ИОК, при което максимум синтезирана ендоглюканаза спрямо контролата (на същите часове) се отчита на 72-я и 96-я час, а активността рязко намалява на 144-я час, при комбинираното използване на ИА-ИОК (1:3), това не е така. Повишаването на активността започва от 48-я час и продължава до 120-я час и въпреки понижаването на ендоглюканазната активност на 144-я час, измерените целулазни единици остават по-високи от контролните. Описаното потвърждава, че различната количествена комбинация цитокинин-ауксин води до специфичен отговор не само при растителните организми, но и при микромицетната култура *T. reesei* M7.

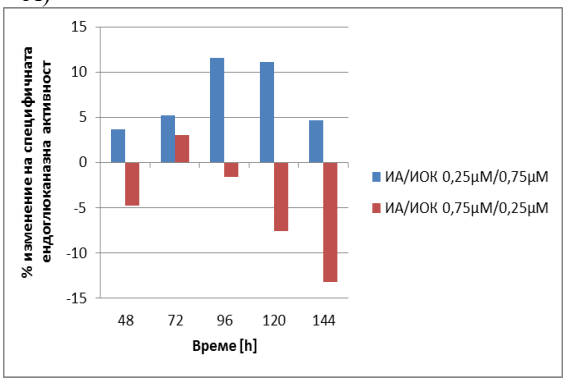
На базата на измерената ендоглюканазна активност и отчетения общ белтък, е изчислена специфичната EG-активност. Резултатите представени на фигура 13 отразяват специфичната ендоглюканазна активност като %-но увеличение/намаление спрямо контролната. Контролата (без добавени фитохормони) е приета за 0 и е дадена на ординатата. Разбирането ни е, че растителните хормони биха повлияли не само биосинтетичната експресия на щама по принцип, но и съотношението на освободените извънклетъчни ензими (в случая ендоглюканаза) в различните варианти.



А)



Б)



В)

Фигура 13. Процент увеличение/намаление на специфичната EG-активност, след добавяне на фитохормони: А) Изопентенил аденин; Б) Индолил оцетна киселина; В) Комбинация ИА-ИОК

Данните за влиянието на изопентенил аденина – било самостоятелно, било когато цитокининът преобладава в комбинацията цитокинин-ауксин – може да се обобщи като инхибиращо специфичната ендоглюканазна активност. Както беше казано с увеличаване концентрацията на цитокинина, расте и инхибиращият му ефект (максималното понижение е 28,8% на 72-я час при използването на 10 μM концентрация). Разглеждайки комбинацията между двата фитохормона (с преобладаващо цитокининово съдържание), прави впечатление, че добавянето на ауксин (ИОК) намалява отбелязания негативен ефект, който отчитаме при самостоятелното използване на ИА върху специфичната EG-активност.

След добавяне на ИОК – самостоятелно и с преобладаващо ауксиново присъствие се наблюдават следните промени в специфичната ендоглюканазна активност:

- В случаите, когато ИОК се използва самостоятелно, забелязаното повишение на специфичната ендоглюканазна активност (при 1 и 1,5 μM концентрация на фитохормона) е с максимум, измерен в ранните часове на ферментацията 48-я и 72-я час (Фиг. 20 Б). При използване на ИОК в концентрация 1 μM повишението е 39,7% за 48-я час и 40,9% за 72-я час. При добавяне на 1,5 μM е съответно 27,9% - 48-и час и 17,8% - 72-и час. Това показва, че при самостоятелното добавяне на ИОК в началните часове на ферментацията екстрацелуларната ендоглюканаза преобладава като компонент от целулазния протеинов комплекс, сравнено с контролния вариант. С напредване на ферментацията присъствието на ендоглюканазен белтък намалява като част от освободения извънклетъчен протеин, въпреки, че отчетената ендоглюканаза нараства.
- Добавянето на ИОК във високи концентрации (10 μM) инхибира ендоглюканазната синтеза, което се отразява и на измерената специфична EG-активност. В това отношение ефектът на индолил оцетната киселина е подобен на влиянието на изопентенил аденина в същата концентрация.
- В комбинация цитокинин(ИА)-ауксин(ИОК) - 1 към 3 (0,25 μM – 0,75 μM) се наблюдава повишение на специфичната ендоглюканазна активност. Максималната специфична EG-активност на 96-я час е 11,6%, а на 120-я - 11,1%.

Получените резултати за влиянието на ИА и ИОК върху продукцията на целулази от *Trichoderma reesei* потвърждават предположението за алелопатично взаимодействие между почвените сапрофити и растенията. Интерес би представлявало подобен тип връзки да се разглеждат в контекста на сезонния цикъл – включващ вариации в температурата и осветеността.

4. Проучване ефекта на Статично Магнитно Поле (СМП) върху натрупването на биомаса и синтеза на целулазни ензими от щам T. reesei M7

Motta et al. (2001) наблюдават ускоряване в метаболизма на *S. cerevisiae* след магнитна стимулация, а *Muniz et al.* (2007) докладват, че прилагането на СМП (220 mT) повишава растежа на биомаса от *S. cerevisiae*. Описани са и резултати отнасящи се до *T. viride*, в които са посочени данни за нарастване на целулазната активност на използвания щам, под влияние на МП (Manoliu et al., 2008).

В настоящето изследване щам *Trichoderma reesei* M7 е третиран със СМП с интензитет от 5,10,40,70 и 400 mT.

Влиянието на СМП върху активността на продуцента изследвахме в следната последователност:

1. Прорастване на споровия материал върху КДА, за 10 денонощия, под въздействието на СМП.

2. Получаване на инокулум в магнитно поле (5-те варианта):

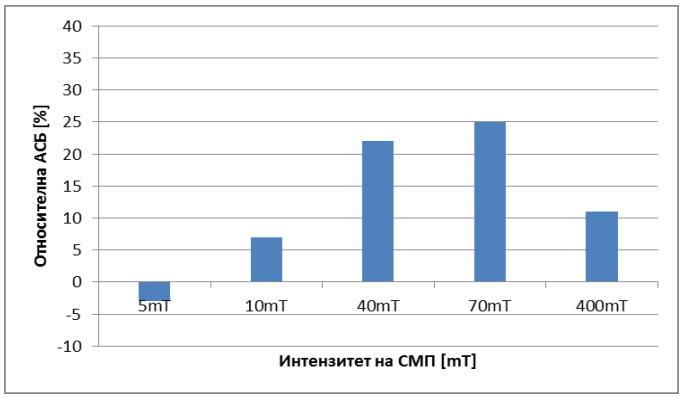
- измерване на АСБ.

3. Извършване на дълбочинна ферментация с цел синтеза на целулазни ензими, в условията на магнитно поле с пет различни интензитета:

- измерване на ендоглюканазната активност, общ белтък и изчисляване на специфичната ендоглюканазна активност от 48-я до 144-я час.

Не е известно магнитното поле да води до трайни, предаващи се в поколенията изменения, особено при сравнително слаби създадени полета. От друга страна ефектът на полето се губи с отстраняване на източника му, поради което, за разлика от повечето проведени от нас експерименти, влиянието на променливата компонента е изследвано цялостно. Опитът не е разделен на три отделни етапа, с три отделни анализа за всеки етап, а дадената по-горе последователност е представена като единен краен ефект.

След получаване на споров материал върху КДА и посев, се проведе дълбочинно култивиране при стандартни условия, с продължителност от 24 часа, за получаване на вегетативна биомаса. Процесът е осъществен в условията на СМП, с интензитети - 5, 10, 40, 70 и 400 mT, измерени от центъра на култивационния съд. АСБ на вегетативния материал е представена като % увеличение/намаление спрямо нетретирания (контролен) вариант (Фиг. 14). Контролата е фиксирана като 0 на ординатата.



Фигура 14. Натрупване на биомаса от продуцента под влияние на СМП

Положителен ефект на МП върху натрупването на биомаса се забелязва при четири от петте третирани варианта. Най-ясно различимо е стимулиращото въздействие при интензитети от 40 и 70 mT (съответно 22% и 25%). Наблюдаваното съвпада с публикувани резултати за нарастване на микробната биомаса (Motta et al., 2001), като евентуалните молекулярни причини се търсят във конформационните изменения, които МП може да предизвиква в белтъчните молекули на ензими, чиито кофактори са магнезий, манган, калций и желязо, променяйки метаболитния потенциал на каталитичното действие (Blanchard et al 1994).

Култивирането на щама с цел синтеза на целулазни ензими, е продължено с извършване на ферментация с продължителност от 144 часа. На таблица 13 са изложени получените резултати за отчетените ендоглюканазна активност и екзоклетъчен белтък от 48-я до 144-я ферментационен час, а на таблица 14 - специфичната EG-активност в същия времеви интервал.

Таблица 13. Синтеза на ендоглюканаза и общ разтворим белтък от щам T.reesei M7 под влияние на различни магнитни интензитети

СМП - интензитет [mT]	***Ендоглюканазна активност [IU/ml]***					***Общ белтък [mg/ml]***				
	48h	**72h**	**96h**	**120h**	**144h**	**48h**	**72h**	**96h**	**120h**	**144h**
Контрола	6,3	16,1	22,9	30,4	30,2	1,22	1,86	2,01	2,11	2,34
5	6,9	15	23,4	31	29,7	1,34	1,96	2,07	2,18	2,29
10	6,1	17,5	22,5	29,9	27,6	1,31	1,89	2,15	2,21	2,37
40	7	19,6	27,6	36,9	31,5	1,56	2,09	2,19	2,43	2,62
70	7,4	20,7	28,2	33,4	28,1	1,49	2,12	2,23	2,48	2,56
400	5,6	12,3	18,4	23,7	20,1	1,08	1,43	1,69	2,03	2,15

Таблица 14. Специфична ендоглюканазна активност на T. reesei M7 след третиране на щама със СМП

СМП-интензитет [mT]	***Специфична ендоглюканазна активност [U/mg]***				
	48h	**72h**	**96h**	**120h**	**144h**
Контрола	5,16	8,66	11,39	14,4	12,9
5	5,15	7,65	11,3	14,22	12,97
10	4,66	9,26	10,46	13,53	11,65
40	4,49	9,38	12,60	15,18	12,02
70	4,97	9,76	12,65	13,47	10,98
400	5,19	8,6	10,89	11,67	9,35

От таблиците се вижда, че ниските магнитни интензитети водят до повишение на ендоглюканазата, екзоклетъчния белтък и специфичната EG-активност. Особено ясно това проличава в случаите, когато ферментацията протича при интензитет на полетата от 40 и 70 mT. Максималното процентно увеличение на ендоглюканазата спрямо контролния вариант при 40 mT СМП е 20,5% на 96-я час и 21,4% на 120-я час, докато при интензитет на полето 70 mT процентният максимум на 96-я час е 23,1%, а на 120-я час - 9,9% спрямо контролата на същите часове. Измереният общ протеин също се повишава, като при интензитет от 40 mT количеството му на 96-я час е с 9% по високо от контролата, а на 120-я час - с 15,2%. Резултатите за екзоклетъчния белтък при СМП от 70 mT са по-високи с 10,9% на 96-я час и с 17,5% на 120-я час. Забелязва се, че в повечето случаи (40 mT - 96-я и 120-я час и 70 mT – 96-я час) на описаните по-горе процентни повишения, нарастването на ендоглюканазата спрямо контролата, е по-високо от нарастването на общия протеин (за един и същи час). Това говори за по-голямо присъствие на ендоглюканаза като съставна част от синтезирания целулазен комплекс на съответните опитни варианти, в съответните часове (сравнено с контролата). Казаното се потвърждава от резултатите, отразяващи специфичната ендоглюканазна активност, представени на таблица 14, от която се вижда, че на посочените часове специфичната активност е по-висока от контролната.

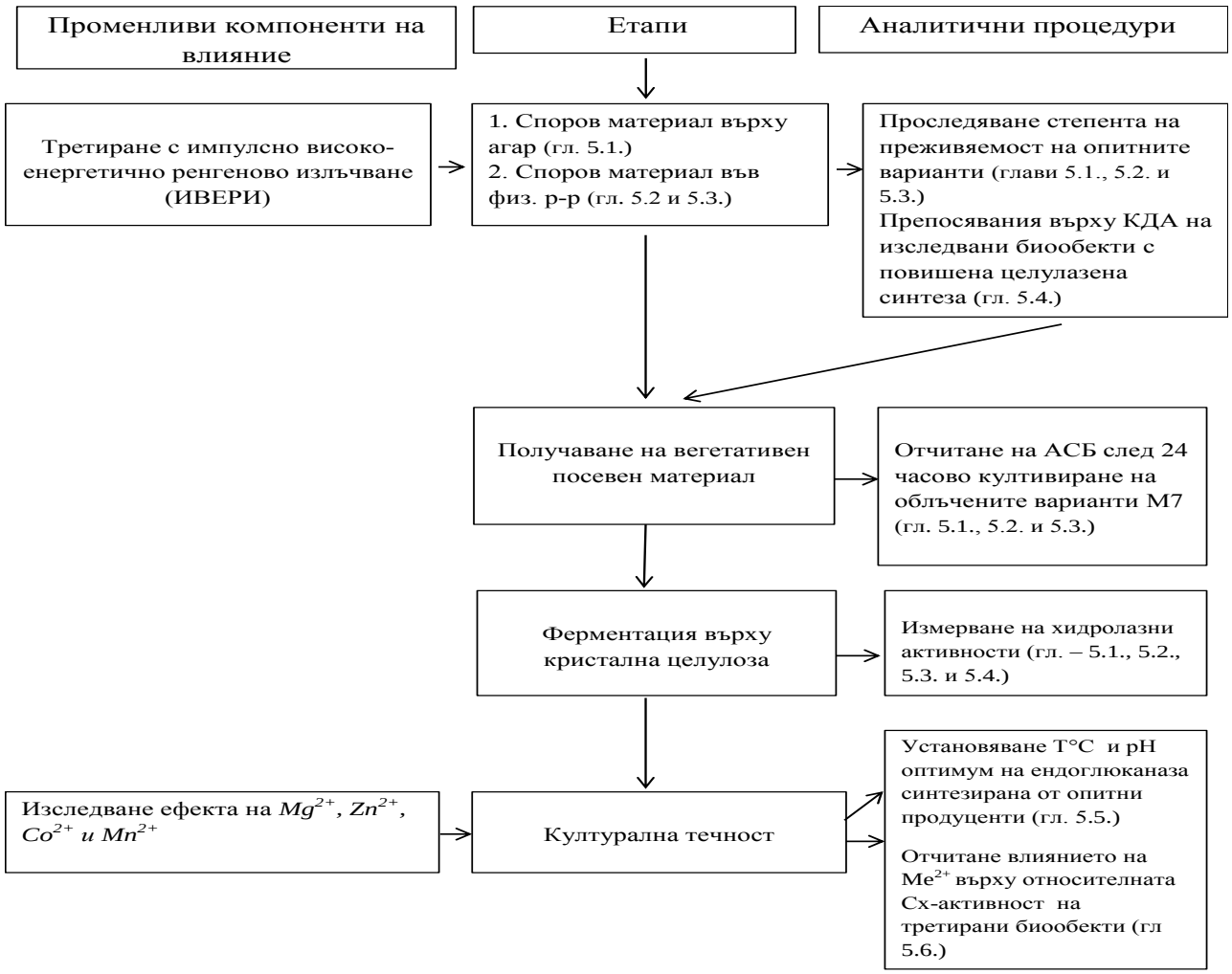
Употребата на СМП е достъпен начин за повишаване биосинтетичните възможности на продуцентите, но приложението му е обвързано с детайлно познаване на специфичното биофизично влияние на полето върху щамовете, използвани в отделните биотехнологични производства.

5. Облъчване на продуцента с Импулсно Високо-Енергетично Рентгеново Излъчване (ИВЕРИ) и проследяване физиолого-биохимичните промени, настъпили в щама

Импулсното високо-енергетично рентгеново излъчване, генерирано от Плазмения Фокус, е много плътен поток от рентгенови фотони, с висока скорост на натрупване на енергетичната доза. Или, което е същото - поглъщането на дозата от облъчения материал се случва в много кратък времеви период (от порядъка на десетки до стотици наносекунди) (Zaprynov et al., 2012; Gribkov et al., 2013).

Опитът се осъществи като облъчените партиди са разделени на три групи. При първата третирането е извършено върху споров материал, развит върху КДА. При втората и третата група облъчването е осъществено след предварително суспендиране на споровия материал от щама във физиологичен разтвор. Разликата между тези две групи е в гъстотата на споровата суспензия, третирана с ИВЕРИ – в единият случай тя е 2.10^6, а в другия 2.10^5 CFU/ml. Представените изследвания спазват описаното разделение.

На фигура 15 е дадена схемата, по която са извършени експериментите в настоящата глава.



Фигура 15. Схема на осъществените проучвания в глава 5.

5.1. Изследване преживяемостта, натрупването на биомаса, синтезата на ендоглюканаза и общ белтък от щам Trichoderma reesei M7, след третиране на продуцента с ИВЕРИ върху полегат агар

Експериментът е проведен с щам *Trichoderma reesei M7*, култивиран 10 дни върху картофено-декстрозен агар, при температура 28°C. Облъчването осъществихме върху 10-дневна агарова култура. На таблица 15 е представена преживяемостта на облъчения споров материал след 7 дневно термостатиране. Резултатите изразяват жизнеността на споровият материал в %-ти спрямо нетретирана контрола. Изходната (контролна) спорова гъстота е 2.10^6 CFU/ml.

Забелязва се високият процент преживяемост на споровия материал, въпреки относително високата погълната доза. При облъчване от 4 до 136 mSv жизнеността на щама остава 100%. По-големите погълнати дози се отразяват незначително върху преживяемостта на M7, като минимумът е 85% (около 10000 mSv) проявена жизненост.

Високата преживяемост, предполага значителна радиационна резистентност на щама, което би могло да бъде потвърдено с измерване на натрупаната биомаса. Количеството биомаса е отчетено след 24 часово култивиране на биообекта върху глюкоза (посевна хранителна среда). На Таблица 15 са представени резултатите в mg/ml - АСБ, както на контролния вариант, така и на третирания материал.

Таблица 15. Преживяемост на споров материал и натрупване на биомаса, след облъчванен на щам T.reesei M7 с ИВЕРИ, върху полегат агар

Погълнатата доза [mSv]	***Преживяемост [%]***	***Суха биомаса [mg/ml]***
Контрола	100	3,90
4	100	3,87
26	100	3,97
97	100	4,03
136	100	4,12
189	94	3,94
205	93	4,06
233	90	3,58
474	94	3,06
522	91	3,46
633	90	3,61
672	89	4,01
917	90	3,96
2475	87	4,02
4532	91	4,14
5788	86	3,89
6549	88	3,93
7867	90	3,97
9700	85	3,88
10287	85	3,69

Измереното количество АСБ на третираните биообекти е сравнимо с биомасата, натрупана от контролния вариант, което допълнително доказва значителния радиационен

толеранс на щама. От таблица 15 се забелязва понижаване на биомасата при погълнати дози между 230-640 mSv, като максимално то е при вариант 474 mSv - 21,5%.

Отчетеното намаление в АСБ е в обратна зависимост на получените резултати за ендоглюканазната активност и екстрацелуларния белтък, след ферментационното култивиране на продуцента. На таблица 16 са представени резултатите на 120-я час от ферментационния процес на щам *T.reesei* M7.

Таблица 16. Ефект на ИВЕРИ върху биосинтетичната експресия на щам Trichoderma reesei M7 (споров материал върху агар), третиран с ПФ

Погълнатата доза [mSv]	***Ендоглюканазна активност [IU/ml]***	***Общ белтък [mg/ml]***	***Специфична ендоглюканазна активност [U/mg]***
Контрола	30,4	2,11	14,4
4	29,1	1,94	15
26	28,9	1,87	15,45
97	30	2,06	14,5
136	29,4	2,19	13,42
189	28,3	1,86	15,2
205	29,5	1,97	14,97
233	34,1	2,41	14,15
474	34,8	2,52	13,8
522	35,7	2,48	14,39
633	33,8	2,31	14,63
672	31,2	2,28	13,68
917	30,7	2,29	13,40
2475	28,4	2,10	13,52
4532	31,2	2,19	14,2
5788	28,6	1,96	14,6
6549	26,9	1,78	15,11
7867	27,5	1,86	14,78
9700	29,3	2,03	14,43
10287	29,6	2,19	13,51

Ясно изразено увеличение на ендоглюканазната активност наблюдаваме за вариантите, погълнали дози от 230-640 mSv. Максимално повишение на EG-активността дава варианта приел 522 mSv радиация. Процентното увеличение спрямо контролата, което се отчита за този вариант е 17,4%. Наред с благоприятното влияние върху синтезата на ендоглюканаза, биоматериалът, погълнал радиация в диапазон 230-640 mSv, показва и по-голямо количество освободен в културалната течност общ протеин – 19,4% (474 mSv) повече от контролата. От резултатите получени за ендоглюканазната активност и екзоклетъчния белтък може да се съди, че ИВЕРИ, в горепосочения диапазон, активира метаболитната експресия на биообекта като цяло. Казаното се потвърждава и от по-ниската специфична EG-активност в тези интервали на облъчване, изчислена и представена на таблица 16.

Йонизираното лъчение, погълнато от останалите опитни варианти, представени на таблица 24, не води до сериозни промени в ендоглюканазната активност и количеството освободен протеин. Не се забелязва тенденция за намаление или увеличение в биосинтетичния капацитет на продуцентите, пропорционално на повишената доза приета радиация.

5.2. Измерване на преживяемост, биомаса, общ белтък и шест хидролазни активности, след третиране на спорова суспензия (2.10^6 CFU/ml) от продуцента Trichoderma reesei M7 с високо-енергетично рентгеново излъчване

За да бъде избегнато влиянието на агаризираната хранителната среда, при отчитане ефекта на ИВЕРИ върху щама, следващите третирания с Плазмен Фокус са извършени върху споров материал, суспендиран във физиологичен разтвор. Облъчени са две спорови гъстоти: 2.10^6 и 2.10^5 CFU/ml (в настоящата глава са изразени резултатите за гъстота на материала от 2.10^6 CFU/ml).

Поради проявената слаба чувствителност на щама към приложените дози, увеличихме броя импулси, с които биологичният материал е третиран, довеждайки погълнатата доза радиация (в нейния максимум) до 45 000 mSv.

На таблица 17 е дадена степента на преживяемост на споровия материал след облъчване. Отчитането на преживяемостта е извършено след посев на третираните спори върху КДА и последващо термостатиране на 28°C.

Таблица 17. Жизнеспособност на щама след облъчване на споровия материал (2.10^6 CFU/ml) с ИВЕРИ и влияние на йонизирано лъчение върху натрупването на биомаса от продуцента

Погълнатата доза [mSv]	***Преживяемост [%]***	***Суха биомаса [mg/ml]***
Контрола	100	3,90
8	100	3,91
29	97	3,82
35	98	3,71
86	97	3,69
137	96	3,64
172	95	3,56
201	97	3,41
237	95	3,26
478	93	3,16
519	90	3,21
546	91	3,18
612	89	3,09
663	90	3,12
1171	86	3,41
2371	84	3,36
4211	77	3,31
5659	74	3,29
6269	76	3,19
7310	75	3,10
7491	72	3,06
9538	72	2,99
10355	71	2,96
11763	70	2,87
12644	71	2,79
19426	69	2,73
31889	64	2,61
42409	62	2,53
45023	63	2,51

Наблюдава се значително по-изразена тенденция към намаляване на преживяемостта с увеличаване на дозата, сравнено с третирания материал върху агар. При по-близките по интензитет погълнати дози се забелязва съвпадаща степен на преживяемост. Не е отразено рязко намаляване в жизнеспособността на споровия материал, въпреки чувствителното (скокообразно) повишаване на дозата. Минималният процент преживяемост е 62%, отчетен при споров материал погълнал значителната доза радиация от 42 409 mSv.

Изследването продължи с култивиране на облъчените варианти върху глюкоза, за 24 часа, с цел получаване на биомаса (вегетативен посевен материал). Количеството натрупана биомаса е дадено в абсолютно сухо тегло (mg/ml) на таблица 17.

Представените резултати ясно изразяват тенденцията за намаляване на биомасата с повишаване на погълнатата доза радиация. Тези данни са в корелация с отчетената понижена преживяемост на споровия материал, вследствие от увеличеното количество прието йонизиращо лъчение. Известно изключение от получената зависимост представляват данните за вариантите, погълнали дози между 230-700 mSv, при които количеството биомаса намалява по-отчетливо, без да се спазва напълно корелационната зависимост със съответния процент преживяемост. Още повече, че понижаването на биомасата е съпроводено с повишен синтез на екзоклетъчен белтък, измерен след провеждане на последващия, същински ферментационен процес (Табл. 18).

Ефектът понижена биомаса – повишен белтък (в диапазон на погълнатите дози 230-700 mSv), е характерен и за споровия материал, облъчен върху агар, което може да означава, че радиацията в този диапазон има универсален стимулиращ ефект върху физиолого-биохимичния потенциал на биообекта, съвпадащ с намалено натрупване на биомаса. От своя страна, обяснението за подобен тип „поведение“ на микроорганизмите може да се търси във филогенетичната датировка на рода, която е от преди 135 милиона години (Kullnig-Gradinger et al., 2002) – време, през което радиационият фон на Земята е бил по-висок от настоящия. Подобни разсъждения могат да продължат – връщайки се назад във времето – до еволюционното таксоно-образуване и последващото родово формиране на *Trichoderma/Hypocrea* видовете.

Експериментите бяха продължени с изследване биосинтетичните промени, настъпили след третиране на споровия материал. Осъществен е ферментационен процес върху Авицел като въглероден източник в хранителната среда. На таблица 18 са представени шест ензимни активности, измерени на 120-я час от култивирането на продуцента, погълнал различни дози радиация. Освен това е представен и общия белтък, синтезиран от опитните варианти на същия час.

Таблица 18. Ефект на ИВЕРИ върху биосинтетичните възможности на щам Trichoderma reesei M7

Погълнатата доза [mSv]	*Ендоглюканазна активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкоз. активност [IU/ml]*	*Ендоксиланазна активност [IU/ml]*	*Ламинариназна активност [IU/ml]*	*Лихеназна активност [IU/ml]*	*Общ разтворим белтък [mg/ml]*
контрола	30,4	3,79	1,51	5,62	0,291	0,131	2,11
8	29,8	3,71	1,44	6,51	0,287	0,129	2,19
29	27,9	3,58	1,54	6,16	0,293	0,134	1,99
35	28,3	3,69	1,39	5,93	0,278	0,133	1,84
86	28,9	3,83	1,45	5,70	0,282	0,126	2,01
137	30,1	3,97	1,63	6,17	0,269	0,127	2,13
172	29,1	3,77	1,42	5,95	0,299	0,130	2,26
201	31,4	3,89	1,58	6,44	0,284	0,137	2,18
237	32,7	3,92	1,62	7,21	0,282	0,128	2,43
478	32,5	3,87	1,68	6,98	0,293	0,141	2,37
519	34,2	4,26	1,79	7,37	0,289	0,137	2,54
546	35,1	4,18	2,16	7,11	0,294	0,139	2,66
612	32,8	4,04	1,70	6,23	0,288	0,126	2,48
663	30,1	3,75	1,65	6,11	0,279	0,135	2,34
1171	29,6	3,64	1,59	5,97	0,290	0,126	2,32
2371	28,7	3,59	1,46	5,44	0,292	0,142	2,19
4211	28,2	3,55	1,39	5,37	0,274	0,134	1,99
5659	29,4	3,68	1,41	5,80	0,276	0,128	2,09
6269	30,2	4,73	1,55	6,21	0,281	0,124	2,17
7310	31,6	3,96	2,98	6,47	0,285	0,146	2,22
7491	29,4	3,77	1,47	6,23	0,276	0,138	2,04
9538	30,8	3,81	1,63	5,80	0,273	0,129	1,98
10355	27,8	3,18	1,35	4,78	0,296	0,137	1,57
11763	34,7	4,58	1,59	6,14	0,288	0,132	2,22
12644	31,9	3,97	1,73	6,62	0,275	0,123	2,37
19426	23,7	2,82	1,34	5,12	0,267	0,127	1,82
31889	36,9	4,72	2,24	7,89	0,292	0,145	2,29
42409	29,8	3,81	1,39	5,82	0,284	0,119	1,96
45023	30,5	3,66	1,26	5,63	0,278	0,127	2,03

Разглеждайки представените на таблицата данни могат да бъдат направени следните обобщения:

В диапазон 230-700 mSv се запазва отчетеното и в глава 5.1. повишение на хидролазните активности, в сравнение с необлъчената контрола. В този случай, обаче, става дума не само за по-висока ендоглюканазна активност, но и за повишаване на активностите и на останалите измерени ензими. Максимум повишение дават вариантите 519 и 546 mSv. За ПФ-519 mSv процентното нарастване е 12,5% за ендоглюканазата, 12,4% - за FPA и 18,5% - за β-глюкозидазата. Значително повишение се забелязва и при синтезата на ендоксиланаза - 31,1% по-висока активност. Що се касае за съпътстващите ламинариназна и лихеназна активности - те са по-ниски от контролния вариант. За ПФ-546 mSv процентните увеличения са: ендоглюканаза

– 15,5%, FP – 10,3% и β-глюкозидаза – 43%. Ксиланазната активност нараства с 26,5%, а ламинариназната и лихеназна активности са приблизително идентични с контролните.

Общият протеин в този диапазон отново е по-висок (519 mSv – 20,4% и 546 mSv – 26,1%) от измерения при контролата, а тенденцията по-малко биомаса, (с която е осъществен посева) - по-голямо количество освободен общ белтък (в процеса на ферментационно култивиране) се запазва за опитните погълнати дози (подобно на глава 5.1.).

Повишеното количеството погълната радиация, не води до определени пропорционални промени в биосинтетичната експресия на микроорганизма, т.е. не се наблюдава закономерност, която да обвързва нарастването на дозата прието йонизиращо лъчение, с конкретен ефект върху целулазния капацитет на микромицета. Интерес представлява вариант 31889 mSv, при който отчетените резултати показват чувствително повишение при всички измерени активности. Процентът увеличение на водещата EG-активност е 21,4%, на FP-активността – 25,5%, а на β-глюкозидазата – 48,3%. Съпътстващата ксиланазна активност нараства със сериозните 40,4%, а макар далеч не така чувствително, повишение има и при ламинариназната и лихеназна активности. Общият белтък също е по-висок от този на контролния вариант (8,5%), но не достига процентното нарастване на вариантите в диапазон 230-700 mSv. Резултатите на посочения вариант представляват интерес и по друга причина – ако за сравнително ниските дози поета радиация (230-700 mSv) може да се говори за чисто физиологично влияние върху биообекта, то при такава екстремно висока погълната доза (31889 mSv), се очакват трайни промени в генетичния материал на продуцента (ефект, който е разгледан в гл. 5.4. и 5.5.).

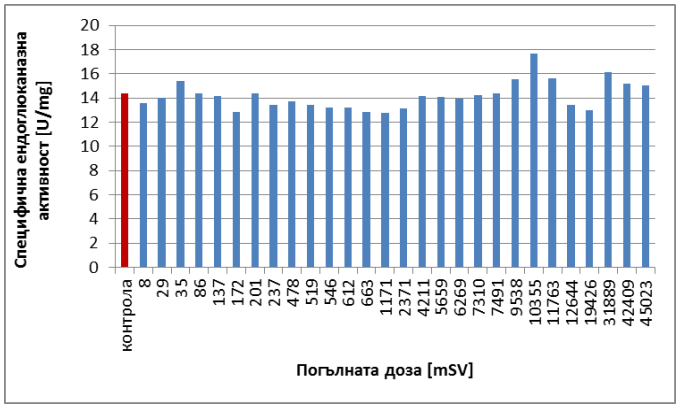
Увеличение на хидролазните активности се забелязва и за вариант 11763 mSv, но то е по-слабо от представеното за 31889 mSv.

Високите дози погълната радиация в някои случаи имат отрицателен ефект върху синтезата на ензими. Пример за това са вариантите 10355 и 19426 mSv. Като при 10355 mSv имаме понижение на четири от шестте хидролазни активности, изключение правят ламинариназната и лихеназната, които са идентични с контролната такава. Количеството общ протеин е значително по-ниско (25,6% понижение спрямо контролата). При вариант 19426 mSv се наблюдава намаление както на шестте хидролазни активности (ендоглюканазата пада с 22%, FPA с 25,6%), така и на измереният екзоклетъчен белтък.

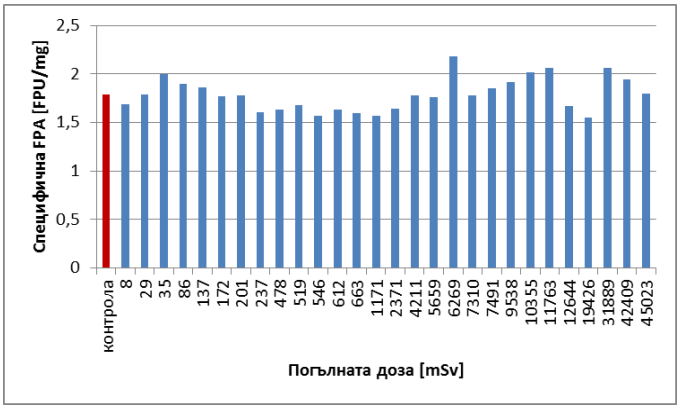
Въпреки посочените примери, не може да се твърди за сериозен негативен ефект на ИВЕРИ върху биообекта, сравнено с погълнатите от продуцента „космически дози“ йонизирано лъчение.

Впечатление правят и вариантите, при които рентгеновото излъчване предизвиква изменения не в целия хидролазен потенциал на щама, а само в отделни ензимни активности. Примери за положителен ефект са вариант 6269 mSv, при който значително нараства FP-активността (24,8% повишение) и вариант 7310 mSv, при който β-глюкозидазата се повишава със забележителните 97,4%. За подобен тип влияние, но с отрицателен знак може да се посочи вариант 45023 mSv, при който β-глюкозидазата намалява с 16,6% спрямо контролата.

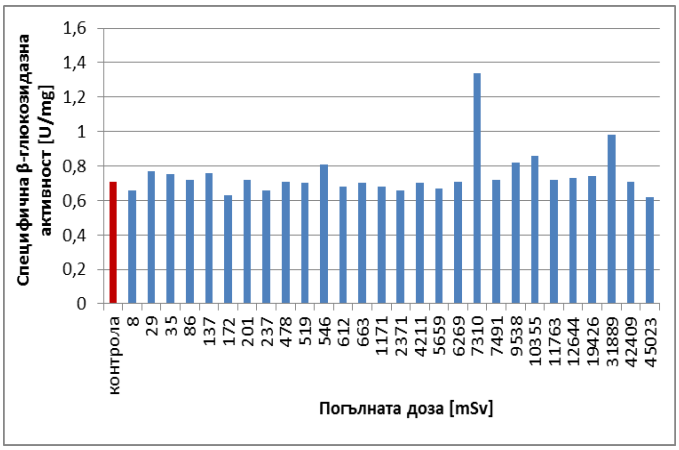
На базата на измерените активности и общ белтък, са изчислени специфичните ензимни активности, представени на фигура 16.



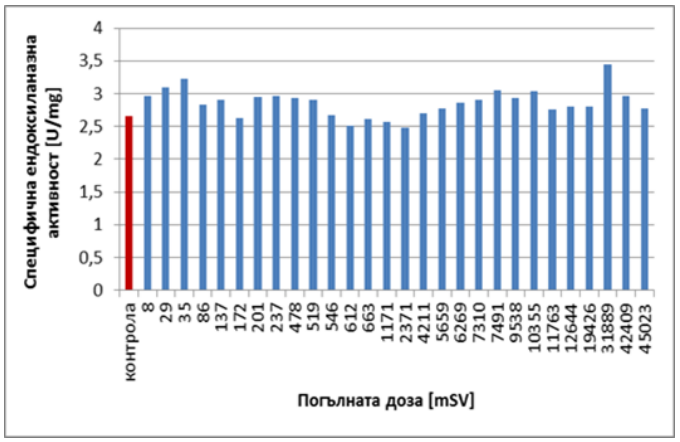
А)



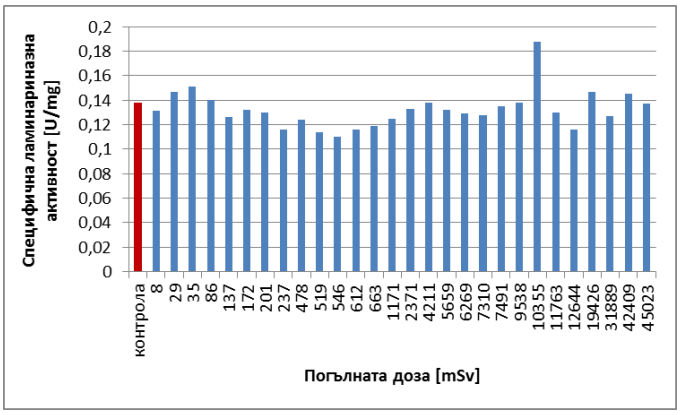
Б)



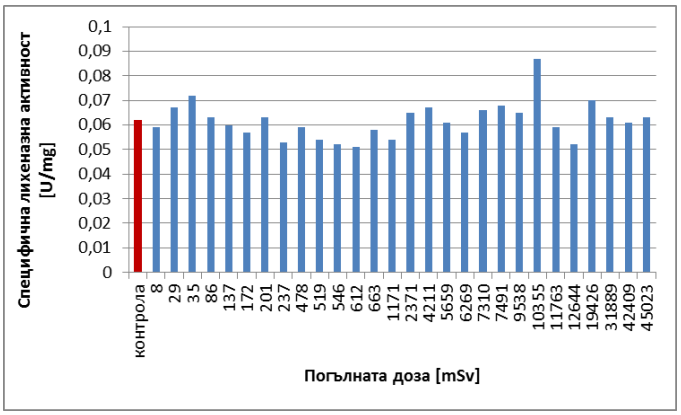
В)



Г)



Д)



Е)

Фигура 16. Специфични ензимни активности след облъчване на споров материал от продуцента с ИВЕРИ: А) Ендоглюканазна, Б)FPA, В) β-глюкозидазна, Г) Ксиланазна, Д) Ламинариназна, Е) Лихеназна

Резултатите показват, че максимални специфични активности се наблюдават в два случая.

Първият се отнася до вариантите, при които има понижение в биосинтетичните възможности на щама, но то не е пропорционално с понижението на освободения екзоклетъчен протеин (ПФ-10355 mSv).

Вторият е, когато имаме повишение в биосинтетичния потенциал на продуцента – отнесено към измерените хидролази, но не така видимо нарастване на екстрацелуларния белтък. Пример за втория случай са варианти 31889 и 11763 mSv, при които са изчислени по-високи специфични активности (сравнено с контролата и повечето други варианти), в контекста на установеното общо увеличение на хидролазната синтеза. Към втория случай спадат също вариант 6269 mSv – показващ максимална специфична FPA и вариант 7310mSv - с максимална специфична β-глюкозидазна активност. При тези експериментални единици обаче не става дума за цялостно завишаване на отчетения хидролазен капацитет, а само за значително по-голямо присъствие на ензимите, детектирани чрез двата посочени анализа, като част от измерения общ белтък.

5.3. Отчитане на преживяемост, биомаса, шест хидролазни активности и общ белтък, след третиране на спорова суспензия (2.10^5 CFU/ml) от продуцента Trichoderma reesei M7 с високо енергетично рентгеново излъчване

Преживяемостта на споровия материал се отчита спрямо контрола със същата гъстота на споровата суспензия, в конкретния случай тя е 2.10^5 CFU/ml (Табл. 19).

За разлика от първите две групи третирани с ИВЕРИ, при по-ниска гъстотата на споровата суспензия, преживяемостта на щама спрямо необлъчената контрола, пада по-чуствително. Вариантът, приел йонизирано лъчение от 45010 mSv, е с жизненост на спорите от 57% спрямо 100-те% на нетретираната контрола.

Експериментът е продължен със следващия култивационен етап – получаване на вегетативна биомаса (Табл. 19).

Биомасата е измерена след довеждането й до АСБ. Използвана е контролната гъстота на посева (2.10^6 CFU/ml) – отнасяща се за цялата представена работа. Отчитането се извърши след проведено дълбочинно култивиране на опитните варианти, за 24 часа, в посевна хранителна среда.

Таблица 19. Ефект на погълнатите дози радиация върху преживяемостта на споров материал от щам T. reesei M7 (2.10^5 CFU/ml) и натрупването на биомаса от продуцента след облъчване с ИВЕРИ

Погълнатата доза [mSv]	***Преживяемост [%]***	***Суха биомаса [mg/ml]***
Контрола	100	3,90
7	100	3,48
28	96	3,29
37	96	3,27
89	94	3,21
134	95	3,22
178	95	3,19
206	94	3,20
232	95	2,76
475	92	2,61
515	91	2,53
541	91	2,56
618	88	2,68
669	89	2,52
1174	85	2,81
2360	83	2,78
4216	74	2,75
5601	74	2,61
6265	73	2,58
7318	74	2,51
7491	71	2,54
9542	70	2,29
10346	69	2,23
11754	67	2,28
12662	66	2,21
19439	64	2,13
31893	61	1,96
42413	59	1,87
42917	60	1,89
45010	57	1,86

Въпреки понижението в жизнеността на споровия материал и отчетеното намалено количество АСБ, трябва да се подчертае резистентността на щама, запазващ виталност, след приетите екстремни дози радиация. Количеството натрупана биомаса, вследствие по-ниската степен на преживяемост на щама, се понижава. При дози радиация над 10000 mSv биомасата пада от 42,8% до 52,3% за 45010 mSv.

Отново се потвърждава, че в диапазон на погълнати дози 230-700 mSv натрупването на биомаса се понижава непропорционално на приетите радиационни дози, макар в случая това да не е така ясно изразено, както за облъчените групи, представени в глави *5.1.* и *5.2.* Екстрацелуларният белтък, измерен на 120-я час от ферментационния процес е завишен (Табл. 20), повтаряйки обратната зависимост между биомасата и белтъка в този диапазон на облъчване.

Таблица 20. Биосинтеза на хидролазни ензими след облъчване на споров материал от щам T. reesei M7 (2.10^5 CFU/ml) с ПФ

Погълнатата доза [mSv]	*EG-активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкоз. активност [IU/ml]*	*Ендо-ксиланазна активност [IU/ml]*	*Ламинари - назна активност [IU/ml]*	*Лихеназна активност [IU/ml]*	*Общ разтворим белтък [mg/ml]*
контрола	30,4	3,79	1,51	5,62	0,291	0,131	2,11
7	29,2	3,81	1,54	5,98	0,292	0,129	2,15
28	28,6	3,78	1,39	5,89	0,285	0,134	2,09
37	29,2	3,51	1,54	5,91	0,287	0,126	2,13
89	28,4	3,73	1,47	5,77	0,284	0,139	2,01
134	28,3	3,81	1,61	6,18	0,298	0,123	1,97
178	29,9	3,49	1,58	5,83	0,278	0,138	2,21
206	30,8	3,81	1,47	5,57	0,283	0,129	2,08
232	32,1	3,89	1,61	5,98	0,276	0,142	2,20
475	33,8	3,77	1,47	6,19	0,296	0,132	2,19
515	35,2	4,35	1,75	6,43	0,285	0,136	2,29
541	35,8	4,21	1,89	7,08	0,289	0,141	2,31
618	31,3	3,91	1,66	7,14	0,282	0,136	2,25
669	30,6	3,82	1,54	6,32	0,267	0,128	2,17
1174	28,1	3,50	1,31	5,87	0,259	0,127	1,97
2360	28,7	3,63	1,49	5,69	0,284	0,119	2,06
4216	29,4	2,49	1,38	5,46	0,285	0,121	1,84
5601	26,8	3,41	1,57	5,11	0,278	0,117	1,69
6265	29,9	4,13	1,61	4,92	0,261	0,145	1,87
7318	28,3	3,66	1,35	5,87	0,291	0,137	1,98
7491	31,5	3,41	1,62	6,12	0,307	0,131	1,86
9542	30,2	3,66	1,34	5,68	0,287	0,118	1,94
10346	28,3	3,18	1,80	6,42	0,305	0,133	2,08
11754	35,3	3,83	2,18	5,93	0,288	0,122	2,24
12662	25,4	3,45	1,41	4,76	0,278	0,143	2,01
19439	37,2	3,86	1,36	6,79	0,251	0,137	2,17
31893	30,6	3,77	1,62	5,74	0,297	0,132	1,99
42413	29,8	3,94	1,43	5,67	0,303	0,139	2,09
42917	42,9	4,94	2,91	7,65	0,298	0,137	2,18
45010	23,7	2,81	1,23	4,41	0,277	0,129	1,74

Полученият вегетативен материал е използван за посев във ферментационна хранителна среда (2% кристална целулоза) и осъществяване на дълбочинна синтеза на хидролазни ензими. На таблица 20 са представени стойностите на шест измерени ензимни активности (ендоглюканаза, FPA, β-глюкозидаза, ендоксиланаза, ламинариназа, лихеназа) и общия протеин, на 120-я час от ферментациония процес.

От представените данни се вижда, че при три от експерименталните варианти, приели високи дози радиация, а именно - 11754, 19439 и 42917 mSv - целулазните активности нарастват. За водещата ендоглюканазна активност увеличението спрямо контролата е съответно: 11754

mSv – 16,1%; 19439 mSv – 22,4%; 42917 mSv - 41,1%. Повишение на FP-активността се забелязва при вариант 42917 mSv – 30,3%. β-глюкозидазата нараства при вариант 11754 mSv – 44,4% и особено сериозно при вариант 42917 mSv, при който активността на ензима е с 92,7% по-висока от контролната. Прави впечатление, че вариант 42917 mSv погълнатата доза, показва цялостно нарастване на хидролазната биосинтеза, като това се забелязва не само за ензимите, част от целулазния комплекс, но е установено и за съпътстващите ендоксиланазна, ламинариназна и лихеназна активности.

Негативният ефект на йонизираното лъчение е най-видим за експерименталния споров материал, приел дози от 12662 mSv и 45010 mSv, при които се отчита общо понижение в биосинтетичните възможности на щама.

Интересни са резултатите за вариант 6265 mSv – при който виждаме по-висока FP-активност (4,13 FPU/ml) спрямо контролата, но по-ниска ксиланазна (4,92 IU/ml). Или вариант 7491 mSv, където е обратното – по-ниска FP-активност сравнено с контролата (3,41 FPU/ml), но по-висока ендоксиланазна (6,12 IU/ml).

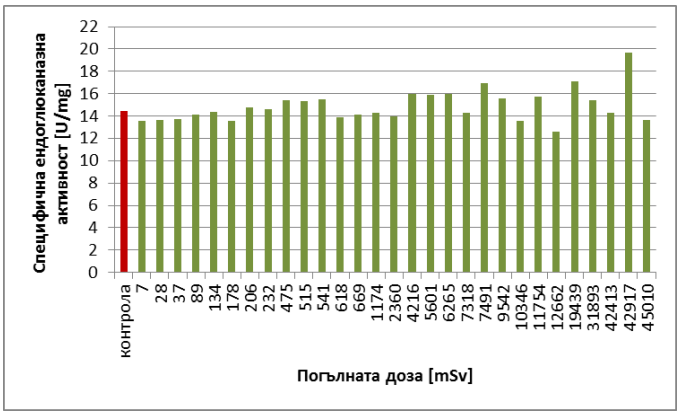
Данните отнасящи се за освободения екзоклетъчен белтък, в конспектиран вид, показват липса на сериозни изменения в количествата екстрацелуларен протеин, синтезиран от опитните варианти, въпреки различните интензитети на облъчване. Минималното количество измерен белтък е 1,69 mg/ml – 5601 mSv, а максималното - 2,31 mg/ml – 541 mSv (при контролен – 2,11 mg/ml).

За вариантите облъчени в диапазон 230-700 mSv е характерно описаното вече повишение на ензимния синтез, както и нарастване на освободения общ протеин.

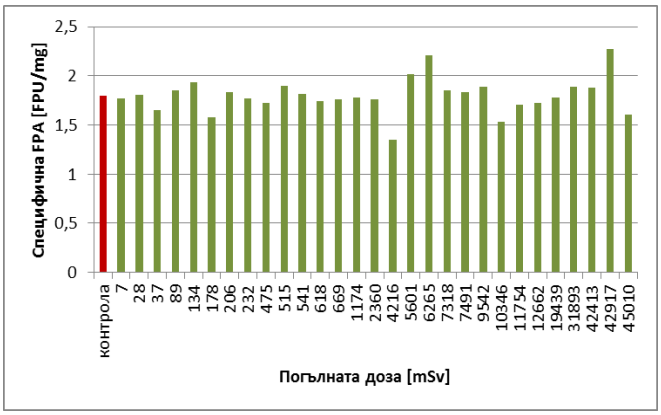
Разглеждайки резултатите представени до сега, може да се каже, че Плазменият Фокус и генерираното от него лъчение променя строго индивидуално физиолого-биохимичните показатели на третирания споров материал. Като изключим вариантите, маркирани от погълнати дози 230-700 mSv, където се забелязва определена повторяема зависимост, която е - намалена биомаса – повишен биосинтетичен потенциал (включително екзоклетъчен белтък), то при другите погълнати дози промяната в метаболитната експресия на щама не е пропорционално обвързана с приетата доза.

Отново трябва се отбележи високата жизненост, която продуцентът запазва, въпреки големите нива на радиация приети от него. При това не само преживяемостта е висока, но и активността на отчетената метаболитна експресия, не просто се запазва, а в някои случаи, забележимо надвишава контролните стойности.

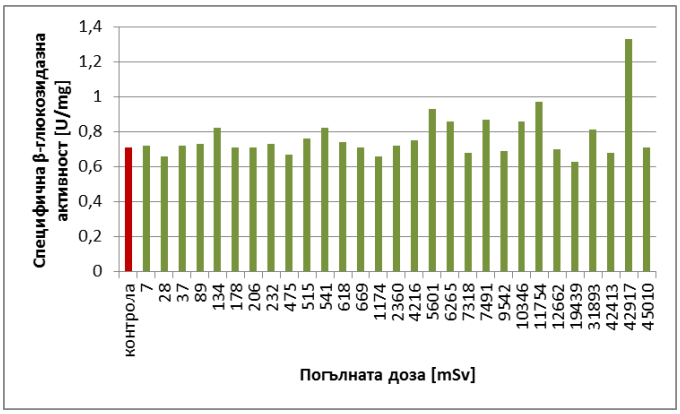
Въз основа на количеството екзоклетъчен белтък и съответната хидролазна активност, са изчислени и представени на фигура 17 специфичните ензимни активности получени на 120-я час от ферментационния процес.



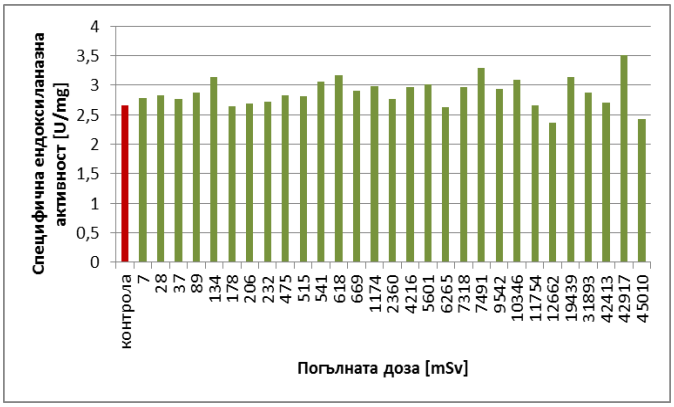
А)



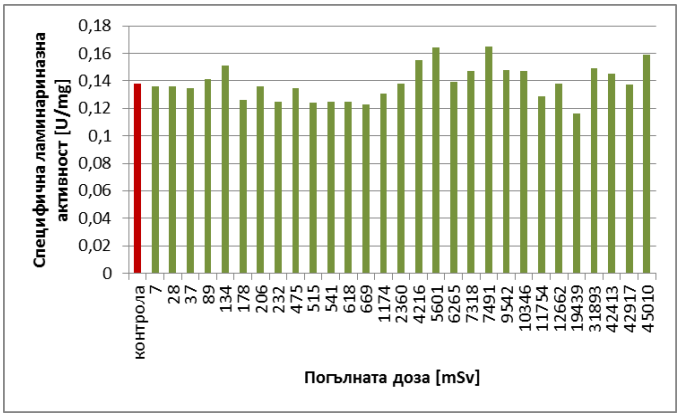
Б)



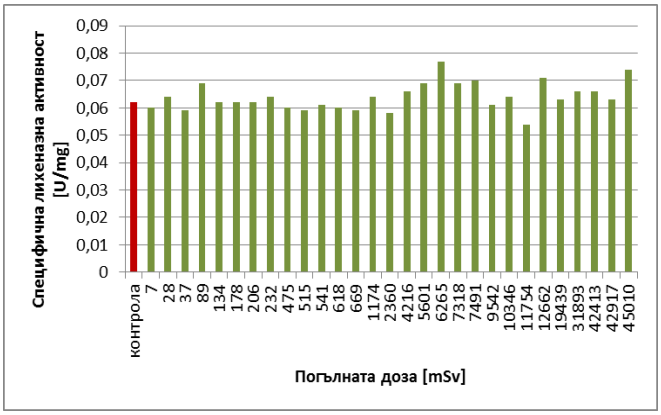
В)



Г)



Д)



Е)

Фигура 17. Специфични хидролазни активности след облъчване на T. reesei M7 с Плазмен Фокус: А) Ендоглюканазна, Б)FPA, В) β-глюкозидазна, Г) Ксиланазна, Д) Ламинариназна, Е) Лихеназна

От представените резултати се забелязва, че специфичните целулазни активности (включително и ендоксиланазната) са максимални при вариант 42917 mSv - вариантът, чиито хидролитичен потенциал е отчетливо повишен от погълнатата доза радиация. Изчисленото увеличение и на специфичните активности, при този вариант, потвърждава, че по-голяма част от освободения екзоклетъчен протеин се пада на целулазния белтък. Особено видно е казаното за специфичната β-глюкозидаза, при която нарастването е с 84,7%.

Високи специфични активности, на основните освободени хидролази, дават и другите два варианта – 11754 и 19439 mSv – при които е отчетено повишение на биосинтетичения потенциал, след облъчване.

Вариант 6265 mSv показва увеличение на специфичната FP-активност, което се дължи на измереното за този вариант, повишение само на тази активност.

Споровият материал, приел доза от 5601 mSv, също в някои от случаите се отличава с високи специфични активности. Причината е в сравнително ниския екстрацелуларен протеин, установен при този вариант.

Разглеждайки множеството опитни варианти, третирани с ИВЕРИ и техните специфични хидролазни активности, се затвърждава твърдението, че въпреки изключително широкия диапазон прието лъчение (от 7 до 45010 mSv), количествената рамка на метаболитната изява

остава далеч по-тясна. Или иначе казано, въпреки вариабилността на третиране, микромицетът запазва биосинтетичната си експресия сравнително постоянна.

5.4. Проследяване във времето на измененията, настъпили в биосинтетичните възможности на третираните с ПФ варианти

След извършване на култивирането и установяване на по-висока целулазна активност при някои от опитните варианти, последва въпроса – дали повишената активност се дължи на моментно физиолого-биохимично влияние на ИВЕРИ върху биообекта, или става дума за трайни, наследствено предавани изменения, настъпили в продуцента.

За отговор на този въпрос извършихме неколкократни препосявания върху КДА на подбрани варианти, с повишена синтеза на целулазни ензими (основно ендоглюканаза), погълнали различни дози радиация.

По този начин индиректно е проследена устойчивостта на хидролазната индукция във времето.

Подбраните варианти, след първото посяване на КДА, са представени като: погълнатата доза, първоначална гъстота на облъчена спорова суспензия, както и измерени активности на трите основни ензима, съставящи целулазния комплекс (Табл. 21). За удобство в таблицата третираните проби са именувани с различно от изходното (контролно) щамово означение. Вариантите са от двете облъчени групи споров материал, суспендиран във физиологичен разтвор. За сравнение са дадени целулазните активности на щам *T. reesei* M7 без облъчване.

Таблица 21. Синтеза на целулази от облъчените варианти, отчетена след първо посяване върху агарова среда

Варианти	*Погълнатата доза [mSv]*	*Първоначално третирана спорова гъстота [CFU/ml]*	*EG-активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкоз. активност [IU/ml]*
Контрола-M7	-	-	30,4	3,79	1,51
PF5E	546	2.10^6	34,9	4,12	2,06
PF11E	11763	2.10^6	34,1	4,51	1,52
PF31E	31889	2.10^6	37,1	4,68	2,19
PF5G	541	2.10^5	35,3	4,17	1,90
PF11G	11754	2.10^5	35,1	3,94	2,09
PF19G	19439	2.10^5	37,5	3,77	1,44
PF42G	42917	2.10^5	42,2	4,97	2,88

Сравнявайки данните от таблица 21, с таблици 18 и 20 (глави 5.2. и 5.3.), може да се каже, че повишените целулазни активности на облъчените варианти се запазват след първото им препосяване върху среда за поддържане (КДА) и осъществена последваща ферментация. Получената вариабилност на измерените активности (за един и същ вариант) е в рамките на аналитичната грешка, докато нарасналите биосинтетични възможности на продуцентите, спрямо нетретирания контролен споров материал, остават постоянни.

След първото препосяване, последователно се извършиха още пет такива. Отново са отчетени ендоглюканазната, FPA и β-глюкозидазната активности. Резултатите са представени на таблица 22.

Таблица 22. Целулазни активности на третирани с ПФ варианти след шест последователни посева на КДА

Варианти	*Погълнатата доза [mSv]*	*Първоначално третирана спорова гъстота [CFU/ml]*	*EG-активност [IU/ml]*	*FPA [FPU/ml]*	*β-глюкоз. активност [IU/ml]*
Контрола-M7	-	-	30,4	3,79	1,51
PF5E	546	2.10^6	31,5	3,61	1,72
PF11E	11763	2.10^6	29,9	3,88	1,56
PF31E	31889	2.10^6	36,3	4,71	2,12
PF5G	541	2.10^5	30,7	3,82	1,61
PF11G	11754	2.10^5	35,8	3,64	2,14
PF19G	19439	2.10^5	36,6	3,79	1,47
PF42G	42917	2.10^5	42,5	4,87	2,71

От представените на таблицата данни става ясно, че по-ниските погълнати радиационни дози имат само активиращо физиолого-биохимично влияние, без променения метаболитен потенциал на опитните обекти да се запазва във времето. До някъде това важи и в случаите, когато имаме по-голяма гъстота на облъчената спорова суспензия. Варианти PF5E, PF11E и PF5G, губят изразените при първото препосяване, по-високи целулазни активности, като се наблюдава реверсия до изходния, контролен целулазен потенциал. Това потвърждава изразената хипотеза, че по-малките погълнати дози (от 230-700 mSv), водят до метаболитна реакция само при конкретния, облъчен споров материал, без унаследяване на измененията. Докато повишените целулазни активности, вследствие погълнати по-високи радиационни дози (в повечето случаи), остават непроменени след шесткратно препосяване на щамовете. Тази стабилност може да говори за наследствено предавани, мутагенни изменения, резултат от ИВЕРИ. Въпреки, че не е спазен технологичният регламент за получаване на свръхпродуценти чрез мутагенез (което практически при влияние с ПФ е невъзможно), резултатите от многократните препосявания косвено го потвърждават. Директно доказателство би представлявал генетичният анализ за степента на полиморфизъм между изходния щам M7 и третираните опитни обекти.

5.5. Определяне на pH и температурен оптимум на ендоглюканазата от някои третирани с ИВЕРИ продуценти

Ендоглюканазната активност, като водеща целулазна активност за щама, в повечето наши проучвания, представлява отправният показател, на базата на който се изследват индуциращите ефекти на използваните в експериментите променливи компоненти на влияние.

Поради това, след подбор на варианти, запазили висока EG-активност, осъществена целулазна ферментация и филтруване на културалната течност - от ензимния комплекс, съдържащ се в нея, избрахме да отчетем именно температурния и pH оптимум на ендоглюканазата. Вариантите, които използвахме в проучването са PF31E, PF11G, PF19G,

PF42G. Температурният оптимум е установен с вариране на температурите от 20°C до 80°C, а pH оптимума проследихме в рамките от 2,5 до 8 (цитратно-фосфатен буфер). На таблица 23 са представени получените резултати. За сравнение са дадени стойностите и на двата показателя, отчетени за ендоглюканаза от нетретирания щам *T. reesei* M7. Всички резултати изразяват относителната ендоглюканазна активност в %, като в таблицата са представени pH и температурната стойност, при които EG-активността е 100%.

Таблица 23. pH и температурен оптимум на ендоглюканаза от третирани с ИВЕРИ биообекти

Опитни варианти	*Ендоглюканазна активност [100%]*	
	pH оптимум	*Температурен оптимум [°C]*
Контрола - M7	5	50
PF31E	5	50
PF11G	5	50
PF19G	5	60
PF42G	5	50

Температурният и pH оптимум на едоглюканазата получена от повечето опитни варианти съвпадат със синтезираната от изходния щам - M7. EG-активността при всички щамове пада до 70% при pH 2,5 и приблизително 90% при pH 8. Вариантите проявяват едва 25% от своята ендоглюканазна активност при темпертура от 20°C и 10% при температура от 80°C. Изключение от казаното се наблюдава само за вариант PF19G, при който отчетеният температурен оптимум на ензима е на 60°C (38,8 IU/ml), но и при този вариант ендоглюканазната активност пада до 90%, когато зададената температура е 80°C.

5.6. Влияние на двувалентни метални йони (Mg^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} и Mn^{2+}) върху относителната ендоглюканазната активност, на третирани с ПФ опитни варианти

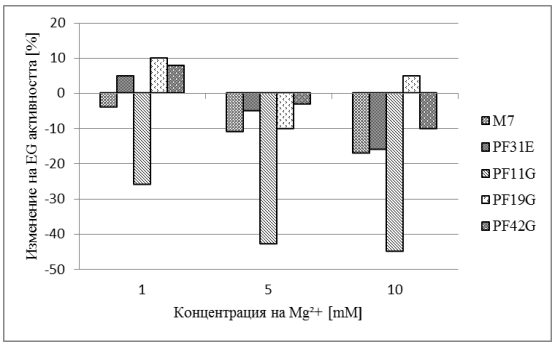
Влиянието на металните йони върху отделни ензимни активности, включително върху целулази, е сериозно проучвано (Бешкова и съавт. 1990; Kim D. W. et al., 2001; Petrova et al., 2002; Gaur and Tiwari, 2015), но изнесените данни не могат да се тълкуват еднозначно. Подходите, които различните автори използват в опитите си (когато ефекта на метала не се търси пряко върху биообекта), са два – 1.) добавяне на металните соли в ензим-субстратната смес, инкубиране и отчитане на резултатите, или 2.) третиране с Me^{2+} само на ензима/културалния филтрат (премахвайки по този начин субстрата като променлив фактор) и последващо ензим-субстратно инкубиране. В представените експерименти е използван вторият подход.

Изследванията са проведени след осъществена дълбочинна ферментация, отделяне на биомасата и добавяне в милимоларни концентрации на използваните метални соли към културалната ензимна смес. Използваната крайна концентрация на металите е 1,5 и 10 mM, а влиянието на йоните върху ендоглюканазата, част от културалния хидролазен комплекс, е измерено след 30 минутно инкубиране (метал-ензим) на 23°C. След което е проследено изменението на ендоглюканазната активност, а резултатите представени на фигура 18 отразяват относителната ендоглюканазна активност в % спрямо контрола, нетретирана с метални йони. Тук трябва да се уточни, че анализът е двуфакторен – от една страна имаме варианти, облъчени с ИВЕРИ, от друга - се изследва влиянието на металните йони върху синтезираната от същите

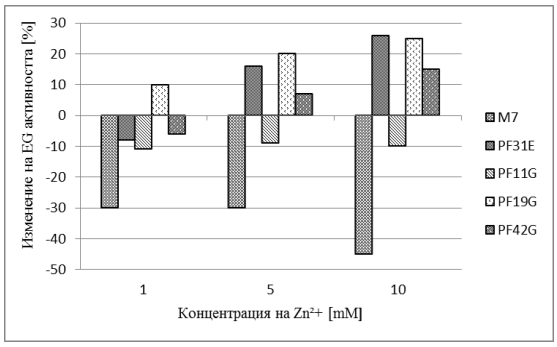
варианти ендоглюканаза. Това наложи за 100% да се приема EG-активността на съответния вариант, погълнал определена доза рентгеново лъчение, но неподложен на влиянието на Me^{2+}. Същевременно имаме културална течност от контролния щам - M7, който не е облъчван с ИВЕРИ, но чиято ендоглюканаза също е инкубирана с Me^{2+} и спрямо която, проверяваме дали влиянието на металите върху ензима специфично се променя, вследствие погълнатата доза радиация (Фиг. 18)

За изразяване на данните, %-ното увеличение или намаление на ендоглюканазната активност е представено като влиянието на трите концентрации на всеки метален йон поотделно, а контролата (ендоглюканаза от съответния вариант без добавени Me^{2+} йони) е фиксирана като 0 на ординатата.

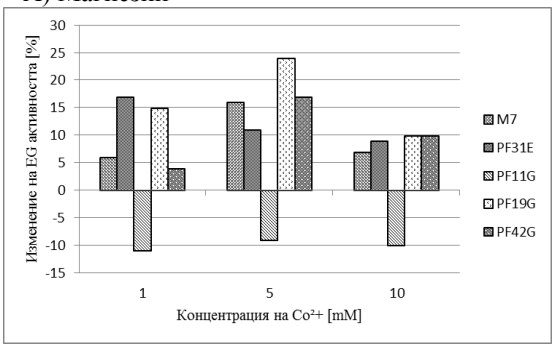
Разглеждайки влиянието на избраните метали, прави впечатление положителният ефект на Co^{2+} върху ендоглюканазната активност (изключение от отбелязаното се наблюдава само за вариант PF11G). При третиране на културалните течности с 5 mM-на концентрация на метала, повишението на EG-активността (спрямо съответната използвана контрола) е най-видно, като за вариант PF19G достига 24%. На другия полюс на влияние е ефектът на Mn^{2+} върху измерената активност – то е изцяло инхибиращо, без значение от използваните концентрации, въпреки, че за повечето варианти с повишаването на концентрацията расте и степента на инхибиране (негативното влияние на Mn^{2+} върху ендоглюканазната активност е описано и от Петрова-Чанкова, 2003).



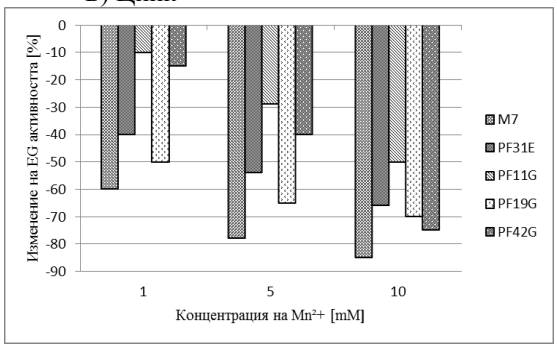
А) Магнезий



Б) Цинк



В) Кобалт



Г) Манган

Фигура 18. Процентно увеличение или намаление на относителната ендоглюканазна активност под въздействието на метални йони

Ефектът на Mg^{2+} и Zn^{2+} е пример за това как приетите радиационни дози променят не само биосинтетичния капацитет на продуцента, но и самите освободени екзоклетъчни метаболити. Може да се каже, че влиянието на Mg^{2+} върху EG-активността е по-скоро

отрицателно, като за вариант PF11G (10 mM-на концентрация) достига до 45% понижение в активността. Това обаче не е така за вариант PF19G, където, при същата концентрация на метала, активността се повишава, макар и с незначителните 5%. Подобно разнопосочно влияние (но не толкова отчетливо) се наблюдава и при добавяне на 1 mM концентрация от същия метал, при което и контролната ендоглюканаза синтезирана от щам M7 и тази на вариант PF11G, понижават активността си (за вариант PF11G то е 26%), докато при останалите три опитни варианта се отчита повишение на активността (максимално – PF19G - 10%).

Още по-многопосочни са резултатите при разглеждане влиянието на различните Zn^{2+} концентрации. Zn^{2+} отчетливо инхибира ендоглюканазната активност на контролния (нетретиран с ИВЕРИ) вариант, като максималният инхибиращ ефект е при най-високата (10 mM) експериментална концентрация на метала – 45%. Докато при същата концентрация на цинковите йони EG-активността се повишава при варианти PF31E, PF19G и PF42G, съответно с – 26%, 25% и 15%.

Проследявайки влиянието на металните йони, в различни концентрации, върху ензимните активности на опитните варианти, прави впечатление многообразието от наблюдавани ефекти. Многообразие, което може да е свързано както с вида и концентрацията на метала, така и със структурни изменения, настъпили в ензимната молекула (вследствие радиационното третиране), променящи белтъчното взаимодействие с металните йони.

6. Комбинирано влияние на лактоза, СМП и ПФ върху синтезата на целулази

В настоящата работа поотделно е представено влиянието на някои променливи компоненти върху синтезата на целулазни ензими от щам *Trichoderma reesei* M7. Внимателно бе проучен ефекът на лактозата, използвана като въглероден източник в различните технологични етапи от култивирането. Освен това върху микромицета бе приложено магнитно поле с различен интензитет, за да се установи ефекта на полето върху биосинтетичните възможности на щама. Благодарение на Плазмения Фокус и генерираното Импулсно Високо-Енергетично Рентгеново Излъчване, са получени култури, които запазват стабилна, по-висока от изходната целулазна активност, в период от шест последователни препосявания на микромицета.

Естествено продължение на проучванията е проследяване на съвместното действие на горепосочените компоненти, повишаващи биосинтетичната експресия на щама. За целта осъществихме ферментационен процес със следната комбинация:

1. Лактоза (0,1%) добавена към ферментационната среда, преди започване процеса на култивирането (0h). Индивидуалното използване на лактозата като индуктор дава следните целулазни активности: ендоглюканаза - 33,2 IU/ml; FPA – 2,44 FPU/ml; β-глюкозидаза - 1,42 IU/ml.

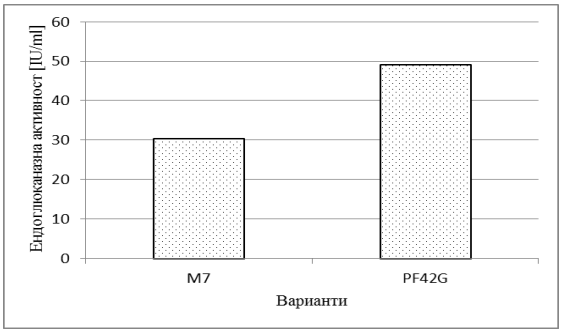
2. Статично Магнитно Поле с интензитет 40 mT, дало максимална ендоглюканазна активност от 36,9 (IU/ml).

3. Вариант PF42G (получен след третиране на щам M7 с ИВЕРИ, 42917 mSv), след шест последователни препосявания и осъществена ферментация, показал максимална целулазна синтеза от: ендоглюканаза - 42,5 IU/ml; FPA – 4,87 FPU/ml; β-глюкозидаза - 2,71 IU/ml.

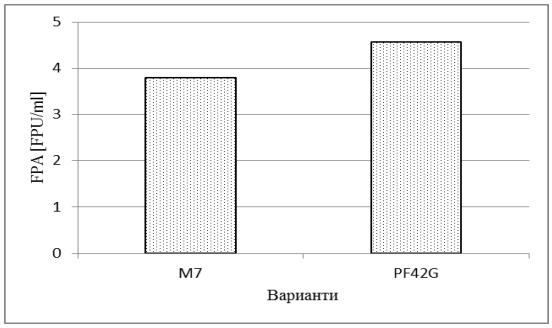
Ферментационният процес е проведен върху кристална целулоза (2%), при стандартни условия. За сравнение използвахме щам *Trichoderma reesei M7,* култивиран при същите условия, но без изследваните компоненти на влияние.

Отчетени са трите главни целулазни активности: ендоглюканазна, FPA и β-глюкозидазна.

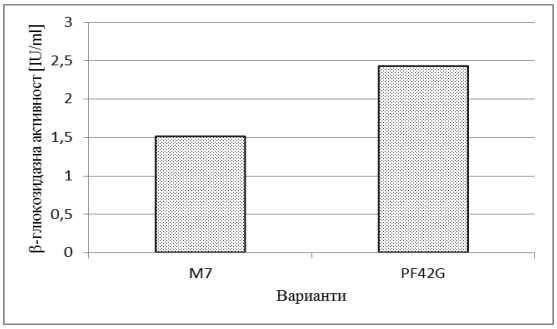
На фигура 19 са изразени получените резултати на 120-я час от ферментационния процес.



А)



Б)



В)

Фигура 19. Целулазни активности, отчетени след проведена ферментация под комбинираното действие на няколко компонента на влияние: А) ендоглюканазна; Б)FPA; В)β-глюкозидаза

От фигурата се вижда, че процентното увеличение на трите активности, спрямо контролните ферментационни условия е съответно: Ендоглюканаза - 61,5%; FPA - 20,3%; β-глюкозидаза - 60,9%.

Спирайки се на водещата ендоглюканазна активност трябва да се каже, че полученото не съответства на очакваното сумарно увеличение на тази активност, ако влиянието на компонентите бъде разглеждано поотделно. Обяснението за това е, че всички целулазни ензими действат синергично спрямо едни и същи субстрати и затова техният биокаталитичен потенциал силно се влияе от наличието и активността на други ензими в средата. От тук, понижената FPA активност, която се отчита при използването на лактозата като индуктор, може да е причината за по-ниска, от сумарно очакваната, обща ендоглюканазна активност.

Въпреки това, от фигурите е видно едно сериозно повишаване и на трите изследвани активности спрямо контролния вариант. Най-ясно изразено е увеличаването на EG-активността, при която то се наблюдава както спрямо контролния вариант, така и спрямо вариантите, при които имаме по единично използване на променливите фактори.

Обобщено може да се заключи, че при оптимизиране условията на култивиране, сериозно внимание трябва да се обърне не само на същинската ферментационна среда, но и на средите за поддържане на работните щамове, както и на тези за получаване на вегетативен посевен материал. Не трябва да спират проучванията за повишаване биосинтетичния потенциал на продуцентите – както чрез селективен, така и чрез мутагенен подбор. Не на последно място при оптимизирането на ферментационните процеси, трябва да се отчита комплексното влияние, на

такива „странични“ физични и химични фактори, като магнитно поле, светлина, естественото взаимодействие между микроорганизмите, синтезиращи целулази и растенията. Особено последното не се радва на нужното внимание от страна на изследователите, забравяйки, че като сапрофит, хидролизиращ целулозата за своите градивни нужди, микромицетите от род *Trichoderma* са тясно свързани с жизнения цикъл на растенията.

7. Изследване влиянието на различни лиопротектори и установяване степента на преживяемост на споров материал от Trichoderma reesei M7 в процеса на лиофилизация

Лиофилизацията е проведена с 7- дневна спорова култура на щама (получена върху КДА), ресуспендирана в шест лиопротектора и физиологичен разтвор, използван за сравнение на резултатите. Експерименталните протектиращи вещества са 10% разтвори на: глюкоза, захароза, Na-глутамат, лактоза, обезмаслено мляко и комбинация от захароза 5% + желатин 0,75% + обезмаслено мляко 5,5%. Гъстотата на изходната споровата суспензия е 1.10^6 CFU/ml. Преживяемостта е изследвана, като след извършената лиофилизация, работната култура е рехидратирана, препосята върху петрита (минимум три на брой) с предварително разлят КДА и след термостатиране е отчетен броя прораснали колонии.

На таблица 24 е представена степента на преживяемост като брой клетки и като % спрямо изходната суспензия.

Таблица 24. Преживяемост на T. reesei M7 след лиофилизация в присъствието на протектори с различен състав

Протекторни разтвори	*Температура на замръзване на протектора [°C]*	*Титър на жизнеспособни клетки [CFU/ml]*	*Преживяемост [%]*
Физиологичен разтвор	-0,59	0	0
Глюкоза 10%	-41	5.10^4	5
Захароза 10%	-32	5.10^4	5
Na-глутамат 10%	-47	6.10^4	6
Лактоза 10%	-28	5.10^4	5
Обезмаслено мляко 10%	-25	$3,6.10^4$	3,6
Захароза 5% + Желатин 0,75% + Об. Мляко 5,5%	-32	$6,6.10^4$	6,6

Получените резултати показват значително намаляване броя жизнеспособни клетки на щама след лиофилизация, в избраните лиопротектори. Преживяемостта пада с 2 порядъка и с над 90%. От използваните варианти най-добро протектиращо действие дава комбинацията захароза+желатин+обезмаслено мляко – 6,6% жизнеспособност.

8. Проучване ефекта на биологично активните вещества, синтезирани от Trichoderma reesei M7, върху растежа in vivo на тест растение - Pisum sativum

Ефектът на биологично активните вещества, синтезирани от щама, върху семената на тест-растението, е изследван след култивиране на продуцента за 120 часа върху Авицел. След проведената ферментация, биомасата е отстранена, а с част от културалната течност се проведе диализа. По този начин в диализната торбичка остават високомолекулните протеини, най-вече синтезираните целулазни ензими, а диализният остатък съдържа само нискомолекулните

метаболити, включително тези с фитохормонално действие. Третирането на семената от грах (сорт Мануела) е извършено с:

1. Културална Течност (КТ) (без диализа), съставена от ензим-хормонална смес,
2. След-Диализен Остатък (СДО) съдържащ предимно нискомолекулни съединени (под 12,4 kDa) и
3. Диализен Концентрат (ДК), в който остават високомолекулните хидролазни ензими (над 12,4 kDa).

Семената са инкубирани с четири крайни концентрации (10x, 100x, 1000x, 10000x) на описаните варианти, добавени към агаризирана MS среда (Мат. и методи - т.14).

Измерванията са разделени на две групи: такива, извършени след 5 денонощия инкубиране на семената на тъмно и отчитане на резултати след инкубиране 5 денонощия в режим светло-8 часа/тъмно-16 часа.

Експериментите включват идентификация на растителните растежни регулатори освободени от продуцента във ферментационната хранителна среда. Отчитане %-а кълняемост, както на контролните (нетретирани) семена, така и на инкубираните варианти. Измерване дължината на зародишното стъбло (епикотил) до първата листна пъпка и дължината на корена – резултатите са представени в сантиметри (cm). Изразяване доза-ефекта (доза-отговор) на тест растението, третирано с различните концентрации на използваните биологично активни вещества.

В началото на опитите чрез LC-MS анализ са определени вида и количеството фитохормонални метаболити, отделени от щама в културалната течност (Табл. 25).

Таблица 25. Метаболити с фитохормонално действие синтезирани от T. reesei M7

Метаболити с фитохормонално действие	*[ng/ml]*
GIBBERELLIN A1	-
GIBBERELLIC ACID (GA3)	0.74
GIBBERELLIN A4	0,63
GIBBERELLIN A5	0,47
GIBBERELLIN A6	-
GIBBERELLIN A7	0.75
GIBBERELLIN A8	-
GIBBERELLIN A9	2,79
N-(2-CHLORO-4-PYRIDYL)-N'-PHENYLUREA (CPPU,4-CPPU)	4.19
THIDIAZURON (TDZ)	30.1
trans-ZEATIN (tZ)	207,28
(±)-cis,trans-ABSCISIC ACID (ABA)	1,48
INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)	-
INDOLE-3-BUTYRIC ACID (IBA)	0,90
INDOLE-3-PROPIONIC ACID (IPA)	14.24
PACLOBUTRAZOL	0,15
UNICONAZOLE	0,09
FLURPRIMIDOL	0,10
ANCYMIDOL	0.26
(±)-JASMONIC ACID (JA)	0,20
ERGOSTEROL (ERG)*	0,41
EPIBRASSINOLIDE (EBI)	0,06
FLURIDONE	-
N6-BENZYLADENINE (BA)	-
(±)2´-EPI-5-DEOXY-STRIGOL	0,09
(±)OROBANCHOL	0,20
2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID	2.75

Резултатите са с грешка ± 3.1 % RSD

От таблицата се вижда, че фитохормоните, отделени в най-голямо количество от микромицета, са от групата на цитокинините (ЦК/СК) - Thidiazuron (TDZ) – 30,1 ng/ml и trans-Zeatin (tZ) – 207,28 ng/ml. ЦК са фитохормони с основна роля в клетъчния цикъл, растежа и диференциацията на растителните тъкани.

Skoog и Miller (1957) са първите представили ауксин-цитокининовата хипотеза, предполагаща задължително съвместното действие на двата растежни регулатора. Във времето научната представа за ауксин-цитокининовите отношения сериозно се разширява и детайлизира, като се установява, че взаимодействието им в някои случаи може да бъде описано както антагонистично, а в други като синергетично. Във всички случаи, обаче, съотношението между техните нива води било до нарастване на меристемната тъкан, било до диференциране на растителните клетки (Werner et al., 2003; Higuchi et al., 2004; Werner and Schmülling, 2009; Su et al., 2011).

Първите отчетени разултати за *Pisum sativum* показват влиянието на ферментационните филтрати върху покълването му. На таблица 26 е даден %-а кълняемост на обработените семена в двата режима на инкубиране: тъмно и светло/тъмно. За 100% е приета кълняемостта на нетретираните (контролни) семена.

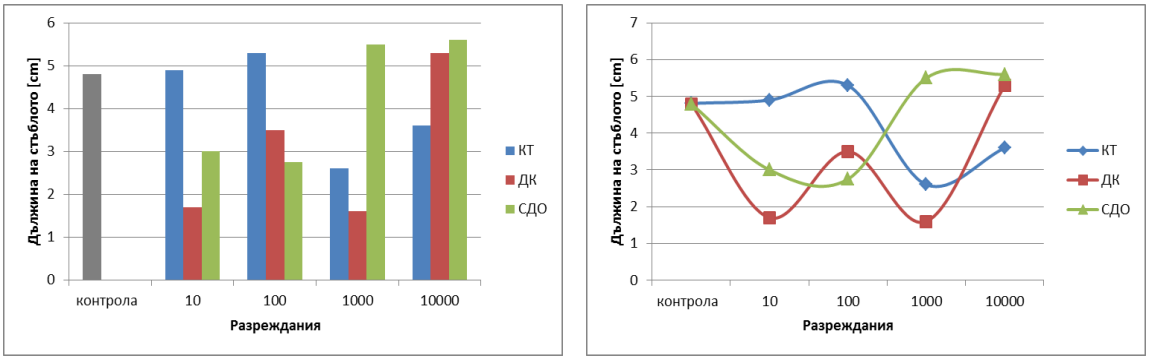
Таблица 26. Кълняемост на семена от Pisum sativum в различните опитни варианти

Варианти	*Кълняемост [%]*	
	Режим - тъмно	*Режим - светло/тъмно*
Контрола	100	100
КТ 10х	112	75
КТ 100х	101	94
КТ 1000х	88	100
КТ 10000х	88	94
ДК 10х	69	63
ДК 100х	88	74
ДК 1000х	74	100
ДК 10000х	112	100
СДО 10х	88	88
СДО 100х	75	100
СДО 1000х	112	112
СДО 10000х	104	112

Изразените на таблицата резултати, показват повишаване степента на кълняемост с увеличаване нивото на метаболитно разреждане, или - при по-ниска концентрация на БАВ кълняемостта нараства, като при някои от вариантите тя е по-висока от контролната такава. Особено ясно изразена е тази тенденция при третираните със СДО семена, като за разреждания от 1000х и 10000х (и при двата режима на инкубиране) се забелязва надвишаване на контролните проценти. Изключение от отбелязаното показват данните за третираните с КТ (режим – тъмно) семена, където зависимостта е обратна.

На фигури 20 и 21 е представено влиянието на БАВ от *T. reesei* – фитохормони, целулазни ензими и културален филтрат – върху растежа на семена от *Pisum sativum* (стъбло и корен), инкубирани в режим – тъмно. Резултатите са визуализирани по два начина – първият (А) акцентира върху промяната в дължината на измервания показател (сам по себе си), докато при втория (Б) акцентът пада върху ефекта от концентрацията на биологично активните вещества върху размера на отчитания компонент и се описва с отношението доза-ефект (крива - доза-отговор).

Получените резултати (Фиг. 20) отразяват влиянието на отделените от щама БАВ върху зародишните стъбла на *Pisum sativum*, след инкубиране на семената - 5 дни на тъмно.

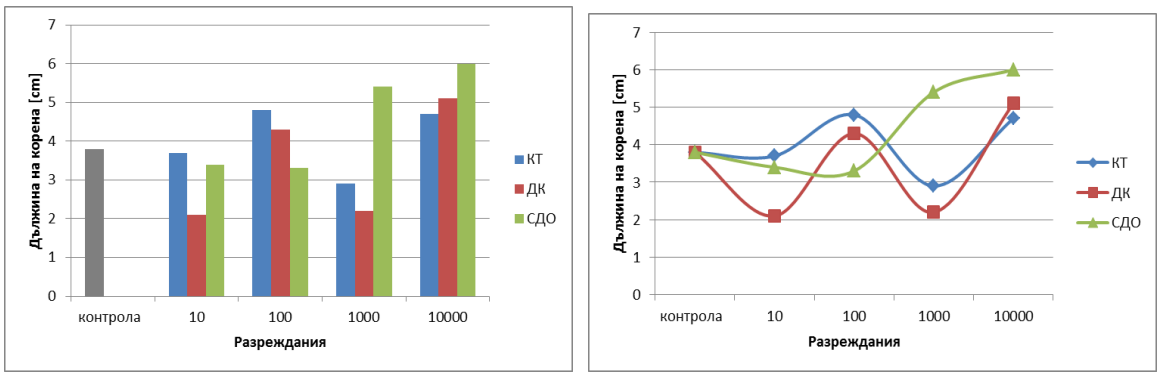


А) Б)

Фигура 20. Проследяване влиянието на БАВ от T. reesei M7 върху стъбла на Pisum sativum (режим – тъмно): А) дължина (ст) Б) криви – доза-отговор

От фигурата се вижда, че при третиране на семената с културална течност, по-ниските разреждания (т.е. по големите концентрации) дават нарастване на епикотилната дължина. При разреждане на КТ 100х измерените зародишни стъбла са с 10,2% по-дълги от контролните. Кривата доза-отговор е по-скоро S-образна, като с понижаване на концентрацията – ефекта на дозата се понижава, а отчетените дължини са по-малки от контролните. При използване на диализен концентрат се наблюдава типична параболична крива доза-отговор. Това означава, че при разреждания от 100х и 10000х се наблюдава максимален ефект. Ако резултатите се сравнят с контролния вариант се забелязва, че при 10000х увеличението на експерименталните стъбла е отново 10,2%. Вариантите с добавен СДО дават по-скоро S-образен профил на кривата, но за разлика от КТ, с намаляване на концентрацията расте и положителният ефект. Над контролните максимуми след-диализният остатък показва при разреждания от 1000х и 10000х, като процентното увеличение, спрямо нетретираните семена е 14,3% за 1000х и 16,4% за 10000х.

На фигура 21 е представено влиянието на синтезираните от микромицета метаболити върху кореновата дължина на *Pisum sativum* (5 дни, режим – тъмно).



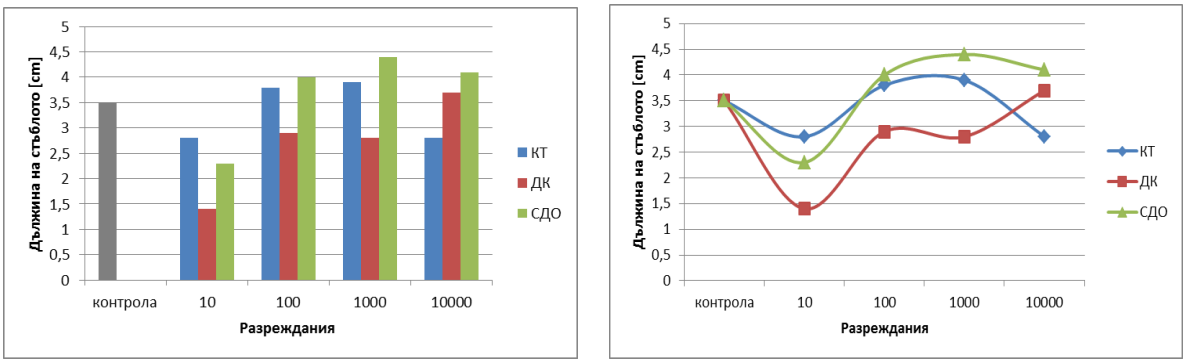
А) Б)

Фигура 21. Ефект на синтезираните от микромицета активни вещества върху кореният на Pisum sativum (режим – тъмно): А) дължина (cm) Б) криви – доза-отговор

Прилагането на културална течност и диализен концентрат водят до параболични криви на отговор, като и при двата компонента на влияние над контролния максимум е при 100х и 10000х. За КТ нарастването е 26,3% (100х) и 23,7% (10000х), а за ДК съответно 13,2% (100х) и 34,2% (10000х). Добавеният след-диализен концентрат значително повишава кореновата дължина, при по-ниските дози на приложение. Кривата доза-отговор отново наподобява S-форма, а максимално увеличение на измервания параметър се забелязва при 1000х и 10000х. Процентният израз на нарастването е 42,1% за СДО-1000х и 57,9% за СДО-10000х.

Експериментите продължиха с установяване ефекта на микромицетните БАВ върху семената на растителния обект, но след инкубация в режим светло-тъмно (8 часа-16 часа). По-този начин дневната светлина се „добавя“ като допълнителен фактор, регулиращ физиологичните пътища на растението, в контекста на микробното метаболитно влияние.

При разглеждането на фигури 22 и 23 прави впечатление, че положителният ефект на микромицетните активни вещества върху тест растението (стъбло и корен), не е така ясно изразен, както при инкубирането на *Pisum sativum* без присъствието на дневна светлина. Фигура 22 представя промените в дължината на стъблата.

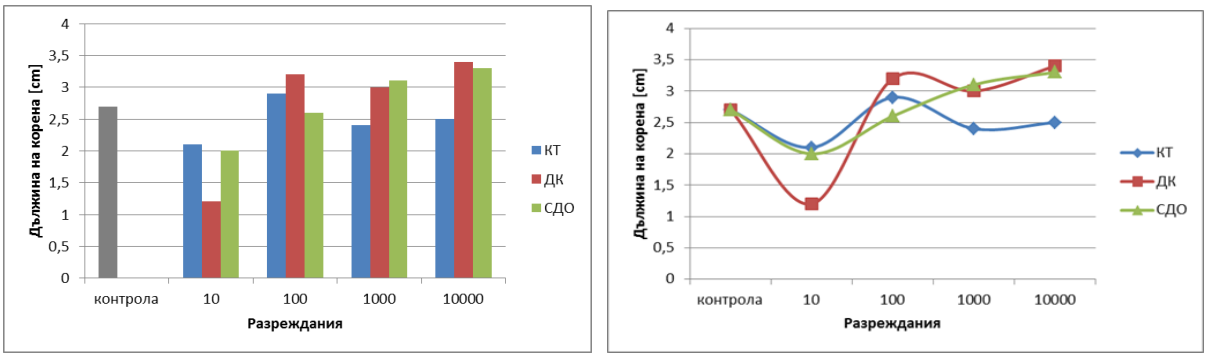


А) Б)

Фигура 22. Влияние на БАВ от T.reesei M7 върху стъбла на грах (режим – светло-тъмно): А) дължина (cm) Б) криви – доза-отговор

От нея е видно, че по-значително нарастване дължината на зародишните стъбла дават семената, третирани със СДО в по-ниски концентрации (разреждания от 100х до 10000х). Максимумът е отчетен при добавяне на СДО 1000х – 25,7% спрямо контролата. Културалната течност при разреждания от 100х и 1000х показва нарастване на растежа с 8,6% (100х) и 11,4% (1000х). Приложеният диализен концентрат, в повечето от направените разреждания има негативен ефект върху дължината на стъблата, като минимално увеличение спрямо нетретираните проби се забелязва при разреждане от 10000х (5,7%).

Промяната в размерите на корените е дадена на фигура 23.



А) Б)

Фигура 23. Ефект на плесенните БАВ върху кореният на Pisum sativum (режим – светло- тъмно): А) дължина (cm) Б) криви – доза-отговор

От фигура 23 се вижда, че добавянето на КТ повишава кореновата дължина с 7,4% (100х), а кривата доза-отговор е обърната U-образна т.е., резултатите при разреждания 10х, 1000х и 10000х са по-ниски от тези за 100х и контролния вариант. Инкубирането на семената с ДК и СДО в по-ниски концентрации, води до нарастване дължината на корените на опитните растения. Максималните разреждания (10000х) предизвикват и максимално увеличение на корените. Процентният израз на нарастването е: ДК-10000х – 25,9% и СДО-10000х – 22,2%.

Обобщавайки получените резултати могат да се направят няколко констатации:

- Позитивното въздействие на микромицетните метаболити върху растителния обект е по-забележимо, когато достъпът на светлина върху семената отсъства. Максималните увеличения както на стъблата, така и на корените на *Pisum sativum* се забелязват, след добавяне в ниски концентрации (10000х) на след-диализен остатък (съдържащ нискомолекулните фитохормонални съединения). Нарастването на стъблата е 16,4%, а на корените 57,9%.
- Оценката на микромицетното влияние върху *Pisum sativum* се усложнява от наличието на целулазни ензими в културалната течност и диализния концентрат (като в ДК хидролазите преобладават). От друга страна, съдържащите се в културалната течност и след-диализният остатък - фитохормони, предизвикват физиологична реакция в тест растението, която може да се обясни с взаимодействие между микромицетните активни вещества и растежните регулатори на самия растителен обект. Щам М7 (както беше отбелязано в табл. 25) освобождава в по-големи количества фитохормони от групата на цитокинините (Zeatin и Thidiazuron), което предполага промяна в ауксин-цитокининовия баланс на растителния организъм, водещо от своя страна, до изменение в скоростта на растежа му. В литературата има предположения се, че някои видове от род *Trichoderma* стимулират растителния растеж чрез регулация концентрацията на ИОК в ризосферата и регулация концентрацията на етилен в корените (Gravel et al., 2007).

- Важно е да се отбележи, че СДО е „отпаден“ продукт от ферментационния процес за получаване на целулазни ензими, т.е. целевото култивиране на микромицета се „съчетава“ с натрупването на биологично активни вещества с фитохормонално действие.

9. Заключение

Широкото приложение на целулазните ензими предполага като следствие многообразие от методи, оптимизиращи целулазната биосинтеза. В настоящата работа могат да се обобщят две посоки на оптимизация:

Първата е разглеждането на всеки отделен технологичен етап от култивирането на микроорганизма като значим сам по себе си. От тук усилията да бъде подобрен състава както на агаризираната среда, на която микромицетът се поддържа, така и на средата за дълбочинно култивиране, на която се получава вегетативен посевен материал. Експериментите са извършени в контекста на влиянието, което тези два етапа от култивирането оказват върху последващата синтеза на целулазни ензими във ферментационни условия. Логичното продължение на опитите беше насочено към оптимизация на самата дълбочинна ферментация и повишаване целулазния потенциал на биопродуцента. Разгледана е ролята на някои моно- и дизахариди, като субстрат и като индуктор за синтезата на целулазни ензими. В изследванията се ръководихме от изясняване ефекта на използваните въглехидрати върху ензимната активност – първо поради факта, че култивиран върху тях микромицетният щам натрупва значително количество биомаса, второ, защото част от тях се явява краен продукт на целулазното действие. Експериментите осъществихме, водени не само от презумпцията за повишаване на целулазната активност, но и с цел оценка степента на евентуално инхибиране, което добавените захари биха имали върху синтезата на целулолитични ензими.

Втората, следвана в настоящата работа посока на оптимизация, е чрез използването на химични и физични елементи на влияние. Проучените ефекти на фитохормоните и магнитното поле представят разбирането ни, че освен познатите физико-химични параметри (T °C, pH и pO_2), регулацията на културационния процес може да се проведе и чрез „по-екзотични“ средства.

Потвърдено е влиянието на фитохормоните (както положително, така и отрицателно) върху ендоглюканазната активност на експерименталния щам. Изследваното самостоятелно използване на ИОК, както и комбинацията цитокинин–ауксин с преобладаващо ауксиново присъствие, повишават EG-активността с 19,2% (96-я час) в първия случай и с 10,2% (120-я час) във втория.

Приложимостта на постоянното магнитно поле се обуславя от неговата практическа неизчерпаемост. Статично магнитно поле с интензитет 40 и 70mT повишава ендоглюканазната активност на *T. reesei* M7 съответно с 21,4 % и 9,9% (120-я час).

Плазменият Фокус, отнасящ се към физичните методи на влияние, заема по особено положение – от една страна ИВЕРИ води до кратковременни физиологични реакции от обработения микроорганизъм, от друга - всяка генерирана радиация може да бъде разглеждана като мутагенен фактор, трайно изменящ биосинтетичния капацитет на продуцента. Трябва да се отбележат и промените (до които ИВЕРИ води) във физико-химичните свойства на изследваната ендоглюканаза от облъчените варианти (глава 5.5.). Използвайки високо-енергетично рентгеново излъчване е достигнато увеличение на ендоглюканазната активност до 42,5 IU/ml, на FPA - 4,87 FPU/ml и на β-глюкозидазната - 2,71 IU/ml, като увеличението е измерено след шестото последователно препосяване на вариант PF42G.

Установена е и голямата резистентност на щам *Trichoderma reesei* M7 спрямо радиоактивно лъчение, което дава възможност за приложение на микромицета при почвена рекултивация и ремедиация, в случаите, когато има радиационно замърсяване на определени земни участъци (например – ремедиация на почви след уранодобив).

Извършено е комбинирано култивиране с използването на вариант PF42G, третиран с 42917 mSv, под влияние на магнитно поле с интензитет 40 mT и добавена лактоза - 0,1% (0h). Увеличението на трите целулазни активности спрямо контролните ферментационни условия е съответно: ендоглюканаза - 61,5%; FPA - 20,3% и β-глюкозидаза - 60,9%.

Не на последно място е изследван ефектът на биологично активни вещества с фитохормонално действие, освободени от щама в процеса на целулазна ферментация, върху растежа на тест растение (*Pisum sativum*). Експериментът е част от по-цялостна картина, включваща:

- Влиянието на фитохормоните върху синтезата на целулазни ензими.
- Съпътстващото освобождаване на растителни растежни регулатори от микромицета, при култивирането му с цел получаване на целулази.
- И ефекта на синтезираните от микромицетния щам фитохормони, както върху растителен обект (съчетано с хидролазните ензими намиращи се в културалната течност), така и върху собствения му (последващ) ферментационен процес.

От казаното следва, че веществата с фитохормонален състав са разглеждани като медиатори, опосредстващи взаимодействието между растителните организми и плесенните продуценти. При това, тези съединения се синтезират и от растенията, и от микромицета – повлиявайки както целулазната експресия на щам-продуцента, но също така и растежа и развитието на растението.

Двете разглеждани посоки на оптимизация съдържат в себе си потенциала за по-детайлна, отнесена към конкретно производство, изследователска работа, в чиято технологична схема, подобен род максимализация на целевия продукт би влязла в употреба.

V. Изводи

1. От подбраните работни щамове M7, QM9414, M27G и M17, най-високи целулазни активности в техния максимум показва щам M7 – ендоглюканаза 30,4 IU/ml, FPA – 3,79 FPU/ml, β-глюкозидаза – 1,51 IU/ml. Чрез SRAP анализ е установена значителна степен на полиморфизъм (40%) между щамовете M7, QM9414, M27G и M17. Секвенционният анализ по ITS рибозомалните гени потвърди принадлежността на щам M7 към вида *Trihoderma reesei.*

2. Доказано е значението на въглеродния компонент в агаризираните среди за поддържане на щам *Trihoderma reesei* M7 и влиянието му върху синтезата на целулазни ензими във ферментационни условия. При съхранение върху кристална целулоза и проведен ферментационен процес са отчетени максимални целулазни активности от: ендоглюканазна 35,2 IU/ml, FPA – 4,31 FPU/ml и β-глюкозидаза – 1,65 IU/ml (120-я час).

3. При използването на безцелулозен субстрат (глюкоза, лактоза, целобиоза и малтоза), щам *Trihoderma reesei* M7 понижава експресията на целулазни ензими. Известно изключение прави употребата на лактоза като индуциращ субстрат, на която щамът освобождава ендоглюканаза с активност от 13,9 IU/ml.

4. Добавянето на лактоза като индуктор (0,1%), в началото на ферментационния процес, повишава водещата ендоглюканазна активност с 9,2%, на 120-я час от култивирането.

5. Цитокининът (изопентенил аденин) добавен във ферментационната среда понижава ендоглюканазната активност, докато ауксинът (индолил оцетна киселина) я повишава. При самостоятелно използване на индолил оцетна киселина (1 μM) максимална стойност на ендоглюканазна активност, спрямо контролата, е отчетена на 96-я час - 19,2%, а при съчетанието изопентенил аденин-индолил оцетна киселина (0,25 μM – 0,75 μM), максималното повишение на ендоглюканазната активност е на 120-я час - 10,2%.

6. Статично магнитно поле с интензитети в интервал 40-70 mT повишава синтезата на ендоглюканаза от щам *T. reesei* M7. Измерената ендоглюканазна активност е 36,9 IU/ml (40 mT, 120-я час) и 33,4 IU/ml (70 mT, 120-я час).

7. Чрез използване на импулсно високо-енергетично рентгеново излъчване са получени варианти с повишен хидролазен капацитет, запазващи високите нива на целулазна синтеза след шест последователни препосявания. Отчетените ензимни активности на опитен вариант PF42G са: ендоглюканазна активност - 42,5 IU/ml, FPA - 4,87 FPU/ml и β-глюкозидазна активност - 2,71 IU/ml (120-я час).

8. Ефектът на двувалентните метални йони върху активността на изследваната ендоглюканаза е разнопосочен, което е признак за изменения настъпили в ензима под влияние на ИВЕРИ и отразяващи се във взаимодействието между метала и ендоглюканазния протеин.

9. Ферментационният процес за синтеза на целулазни ензими, съчетал комбинацията от опитен вариант PF42G, получен след третиране с ИВЕРИ, СМП с интензитет 40 mT и добавена лактоза (0,1%, 0h), дава повишение на ендоглюканазната активност с 61,5%, FPA - 20,3% и β-глюкозидазната - 60,9%, спрямо контролните условия на провеждане.

10. От използваните лиопротектори в процеса на лиофилизация на щам *T. reesei* M7, максимална преживяемост на микромицетния споров материал се отчита след прилагане на протектиращата комбинация от захароза 5% + желатин 0,75% + обезмаслено мляко 5,5%.

11. Прилагането на след-диализен остатък (10000x), съдържащ нискомолекулни фитохормонални съединения, върху семена от грах (инкубирани без достъп на светлина) повишава растежа на стъблата с 16,4%, а на корените с 57,9%.

VI. Приноси

Приноси с научен характер:

1. SRAP анализ ефективно е използван за установяване на полиморфизъм между генетично близки микромицетни щамове, получени в резултат на мутагенез.

2. Импулсният характер на високо-енергетичното рентгеново излъчване, променя както биосинтетичния капацитет на биообекта, така и физико-химичните свойства на освободените ензими.

Приноси с научно-приложен характер:

3. Потвърдено е таксономичното отнасяне на щам М7 към вида *Trichoderma reesei* чрез секвенционен анализ по ITS рибозомалните гени

4. Доказано е, че статичното магнитно поле (с възможност за неограничено времево приложение) повишава биосинтетичните възможности на *T. reesei* М7.

5. Постигнато е повишаване на биосинтетичния потенциал на *T. reesei* М7, чрез генерирано от Плазмен Фокус рентгеново лъчение.

6. Доказана е способността на *T. reesei* М7 да поглъща големи дози йонизирано лъчение (до 45000 mSv), което е предпоставка за прилагането на микромицетния щам като компонент в препарати за почвена ремедиация на радиационно замърсени земни участъци.

7. Установеният положителен ефект на синтезираните от микромицета фитохормонални съединения върху семената от *Pisum sativum,* дава възможност за използване в земеделието на тези съпътстващи синтезата на целулазни ензими метаболити.

Списък на научните публикации във връзка с дисертацията

1. **Orlin Gemishev**, Stanislav Zapryanov, Alexander Blagoev, Maya Markova, Valentin Savov, Effect of multiple short highly energetic X-ray pulses on the synthesis of endoglucanase by a mutant strain of *Trichoderma reesei*-M7, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014, doi:DOI:10.1080/13102818.2014.966543, Ref , IF/IR .

2. Alexandar Blagoev, Stanislav Zapryanov, Vasilii Gol'tsev, **Orlin Gemishev**, (2014). Plasma focus - a pulsed radiation source. Radiation Protection Journal, 2014, том:3, стр. 54-59.

3. **O. Gemishev**, P. Dimova, N. Panova, Y. Evstatieva, Effect of static magnetic field on synthesis of endoglucanase by *Trichoderma reesei* M –7, Biotehnology & Biotehnological Equipment, том:23, 2009, стр.848-851, Ref.

4. **O. T. Gemishev**, I. I. Vaseva, A. P. Atev, Abscisic acid and ethylene influence on endo-1,4-B-glucanase activity in *Trichoderma reesei* I-27, Biotehnology & Biotehnological Equipment, том:19, брой:3, 2005, стр.106-112.

5. **Orlin Gemishev**, Irina Vaseva, Daniela Galabova, Tereza Bankova, Svetla Ilieva, Study of indol-3-acetic acid, isopentenyl adenine and abscisic acid effects over cellulose production in *Trichoderma reesei* strain I-27, Annuare de l'Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski", том:96, книга:4(1), 2005, стр.395-401.

Optimization of the synthesis and the production of cellulase enzymes by fungal producers

Orlin Tsvetanov Gemishev

Abstract

Widespread use of cellulase enzymes suggests as a result a great variety of methods, optimizing cellulase biosynthesis. Two directions of optimization can be summarized in the present work:

The first one is examining each process step of culturing the microorganism as significant in itself. This explains the effort to improve the composition of both mediums – the agarized medium on which micromycetes are maintained, and the submerged culture medium for the formation of vegetative inoculum. Experiments were carried out in the context of the impact that these two stages of cultivation have on subsequent cellulase fermentation process. The logical continuation of experiments was focused on the optimization of the cellulase fermentation and the increasing of hydrolase potential of the producer. The role of certain mono- and disaccharides as a substrate for cellulase synthesis on one hand and as an inductor for such synthesis in the other was studied. The experiments we made, guided not only by the presumption of stimulation of cellulase activity, but also to assess the extent of any inhibition that added sugars would have on the synthesis of hydrolases.

The second direction followed in this work towards optimization is through the use of chemical and physical elements of influence. Investigated effects of phytohormones and magnetic field present our understanding that in addition to the known physico-chemical parameters (T°C, the pH and pO_2); the regulation of the cultivation process can be carried out by more "exotic" means.

The influence of phytohormones (both positive and negative) on the synthetic expression of experimental strain was confirmed. Using IAA, and the combination cytokinin-auxin with predominantly auxin presence the Cx-activity was raising with 19,2% (96th hour) in the first case and by 10,2% (120th hour) in the second.

The applicability of the static magnetic field is determined by its practical inexhaustibility. A problem that should be solved with scientific research concerning both the magnetic field and the other described components of influence is their individual effect on specific biological system. In our case the field intensity 40 and 70mT increases endoglucanase activity of *T. reesei* M7 respectively 21,4% and 9,9% (120th hour).

Plasma Focus that relates to physical methods of influence, occupies a special position - on the one hand pulsed high energy X-ray radiation leads to short-term physiological effects in the living organism, on the other - each generated radiation can be regarded as mutagenic factor permanently altering the synthesis capacity of producer.

It should be noted also the changes in the physicochemical properties (caused by the pulsed high energy X-ray radiation) of experimental metabolites of irradiated bio-objects. Using the high-energetic X-ray emission was achieved an increasing in endoglucanase activity to 42,5 IU/ml, FPA - 4,87 FPU/ml and β-glucosidase - 2,71 IU/ml, as the increasing is measured after six consecutive passagings of producers, which speaks of hereditary changes in the strain, retaining the synthesis increasing over time.

A great resistance of the species *Trichoderma reesei* against radioactive radiation was detected, which enables administration of this species in soil remediation, in cases where there is radioactive contamination of certain earth sites (for example - remediation of soils after uranium mining).

A cultivation combined with the use of variant PF42G treated with PF- 42 917 mSv, under the influence of a magnetic field intensity of 40 mT and added lactose - 0,1% (0h) was carried out. The increasing of the three cellulase activities compared to control fermentation conditions is respectively: endoglucanase - 61,5%; filter-paper - 20,3% and β-glucosidase - 60,9%.

Last but not least, it was investigated the effect of phytochormones released from the strain during the cellulase fermentation process on the growth of the test plant (*Pisum sativum*). Phytochormones composition substances are considered as mediators intervening to the interaction between plant organisms and fungal producers. However, these compounds are synthesized by plants and by fungi - influencing both – the fungal cellulase expression and the growth and development of the plant.

Keywords: *Trichoderma reesei*, endoglucanase, cellobiohydrolase, β-glucosidase, static magnetic field, plasma focus, phytochormones