

10. Murashige T., Skooge F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 1962.15(3):473 11—497.

11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов

исследований). Учебники и учеб. пособия для высш. учеб. заведений. 5-е изд., доп.и перераб. М.: Агропромиздат, 1985. [Dosphehov B. Metodika polevogo opyta. Moskva. Agropromizdat. 1985. (In Russ).]

УДК: 579.873.11.017:631.46.(479.22)

ШТАММ ГРИБА РОДА *TRICHODERMA HARZIANUM*-25/П ПРОДУЦЕНТ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

DOI: [10.31618/ESU.2413-9335.2020.9.74.794](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2020.9.74.794)

¹**Б.К.Мухаммадиев,**

к.б.н., доцент,

²**Р.Д.Муминова,**

к.с/х н.

^{1,2}Ташкентский Государственный аграрный университет,
100140, Узбекистан, г.Ташкент, ул. Университетская-2

АБСТРАКТ

Подобран ряд сред для культивирования и оптимизированы условия для биосинтеза фермента, в дальнейшем можно использовать при разработке технологии ферментация дешевых целлюлозосодержащих отходов и получения на основе этого ферментов. В результате исследований установлены оптимальные условия для культивирования гриба *Trichoderma harzianum*-25/П, способствующие активному синтезу целлюлолитических ферментов: среда Чапека-Докса с 0,5% кукурузного экстракта и 3% фильтровальной бумаги, pH 5,0; культивирование глубинное в течение 8-10 суток; температура 30-35 °С.

Ключевые слова: биосинтез, фермент, отход, сахар, продуцент, целлюлаза, целлюлоза, гриб, гидролиз, субстрат.

Введение: За последние годы изучены многие представители грибов, продуцирующие целлюлолитические ферменты. Однако относительно целлюлолитической активности *Trichoderma harzianum* данных в литературе мало. Имеющиеся сведения касаются активности термотолерантных штаммов этого гриба [1-4].

Настоящая работа посвящена изучению влияния условий культивирования на синтез целлюлолитических ферментов мезофильного штамма *Trichoderma harzianum*-25/П, выделенного нами из почвы Ташкентской области.

Материалы и методы исследования: Гриб выращивали в лабораторных условиях глубинным способом в 250 мл колбах (100 мл среды) на круговой качалке (скорость вращения 180-200 об/мин) при температуре 30°C на среде Чапека-Докса с 2-3% фильтровальной бумаги.

В фильтрате культуральной жидкости определяли активность C_1 и C_x -ферментов. Активность C_1 -фермента, гидролизующего нативную целлюлозу, определяли по количеству растворимых сахаров, образовавшихся при действии фермента на хлопковое волокно. За единицу активности C_1 -

фермента принимали такое его количество, которое за 24 часа действия в принятых условиях (t 40°, pH 4,5) образовывало 1 мг глюкозы.

Активность C_x -фермента, действующего на растворимые производные целлюлозы, определяли вискозиметрическим методом по падению вязкости 0,3%-ного раствора Na-КМЦ и по количеству редуцирующих сахаров, образовавшихся при гидролизе 1%-ного раствора Na-КМЦ под действием культуральной жидкости. Культуральную жидкость перед определением активности развели фосфатным буфером в 50 раз. За единицу активности C_x -фермента принимали такое его количество, которое за 1 час действия при принятых условиях (температура 30° и pH 5,0) образовывало 1 мг глюкозы.

Результаты исследования: Изучение динамики накопления ферментов в культуральной жидкости гриба показало, что активность C_1 -фермента достигает максимума на 8 сутки культивирования. Активность C_x -фермента максимально проявляется на 10 сутки, а затем происходит медленный спад активности ферментов (рис.1).

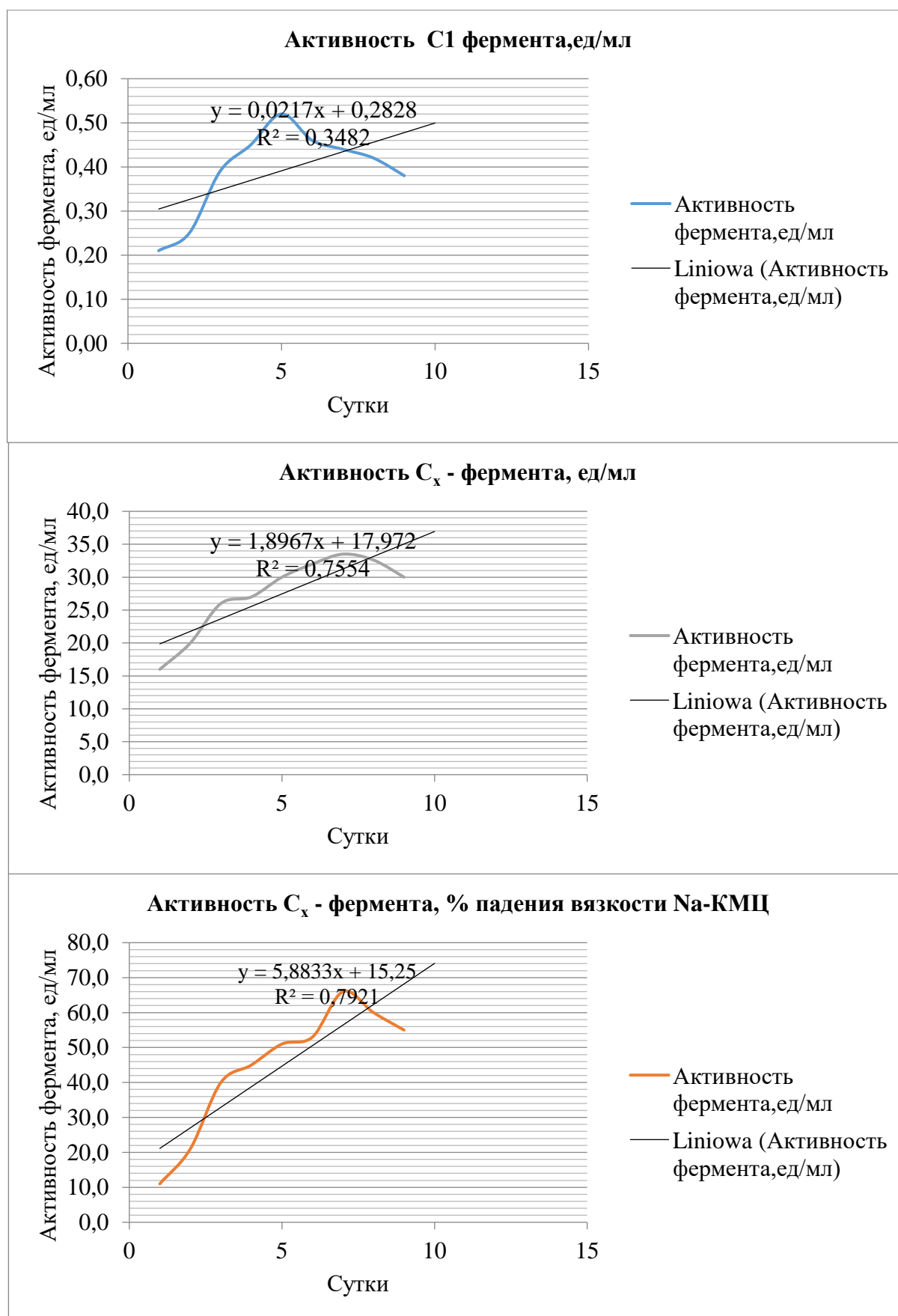


Рис.1. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от срока культивирования: 1-активность C₁-фермента, ед/мл; 2-активность C_x-фермента, ед/мл; 3-активность C_x-фермента, % падения вязкости 0,3% Na-КМЦ;

Различие в сроке накопления ферментов, очевидно, связано с тем, что C₁-фермент

производит первоначальный гидролиз целлюлозы, в то время как C_x -фермент действует на продукты ее распада.

Развитие гриба в питательной среде сопровождается изменением pH с 5,0 (исходное) до 7,1-7,3 (в 10-суточной культуре).

Культивирование гриба в течение 10 суток при равных температурах показало, что оптимальная температура для его роста и накопления целлюлолитических ферментов 30-35°C (рис.2). При 40°C наблюдается слабое развитие гриба и образование целлюлолитических ферментов.

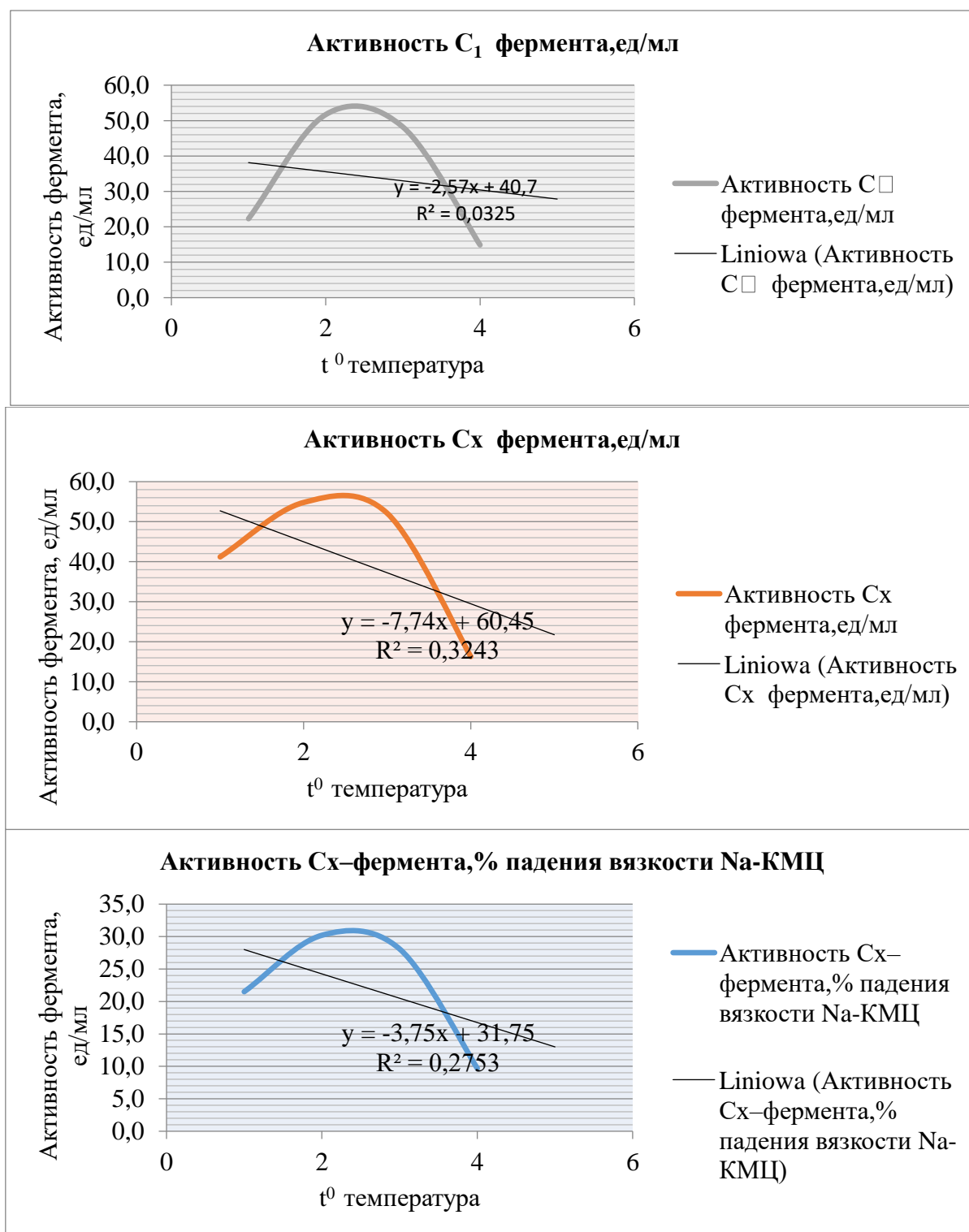


Рис.2. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от температуры культивирования.

При выращивании гриба в питательной среде с различным исходным значением pH (3,5-7,0) установлено, что оптимальная реакция среды для

роста гриба в биосинтезе им C_x -фермента-5,0, для C_1 -фермента в пределах 4,5-5,0 (рис.3).

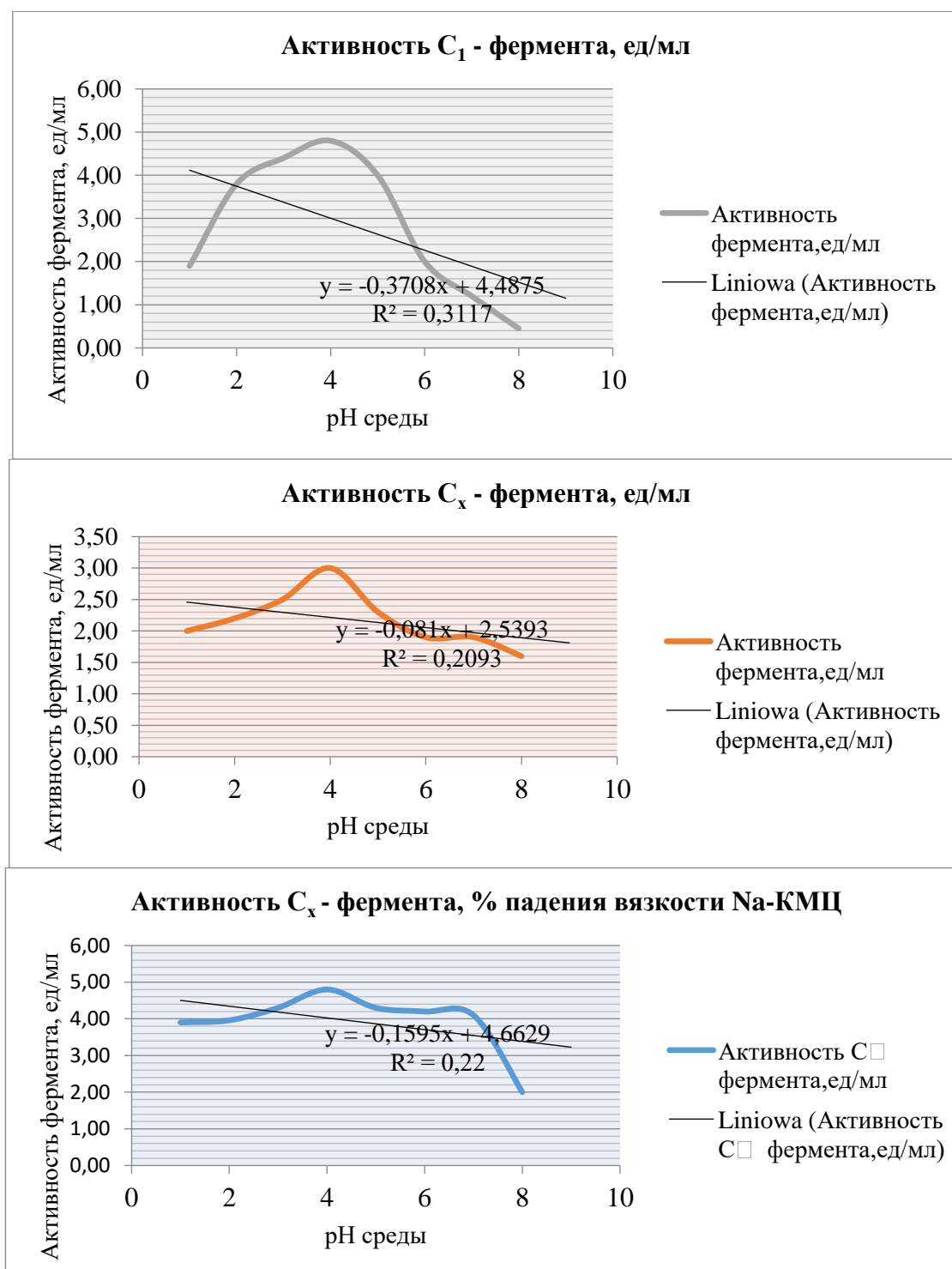


Рис.3. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от исходного значения рН среды.

Из литературы известно, что замена минерального источника азота в питательной среде органическим часто способствует более энергичному росту грибов и образованию ими целлюлолитических ферментов. Полагают, что стимулирующую роль при этом играют, аминокислоты и другие биологически активные вещества, которые находятся в субстратах.

По нашим данным внесение в питательную среду Чапека-Докса вместо NaNO_3 пептона (0,1-0,5%) не стимулировало рост в целлюлолитическую активность гриба, тогда как добавление кукурузного экстракта в количестве 0,5% способствовало улучшению роста и биосинтеза целлюлолитических ферментов.

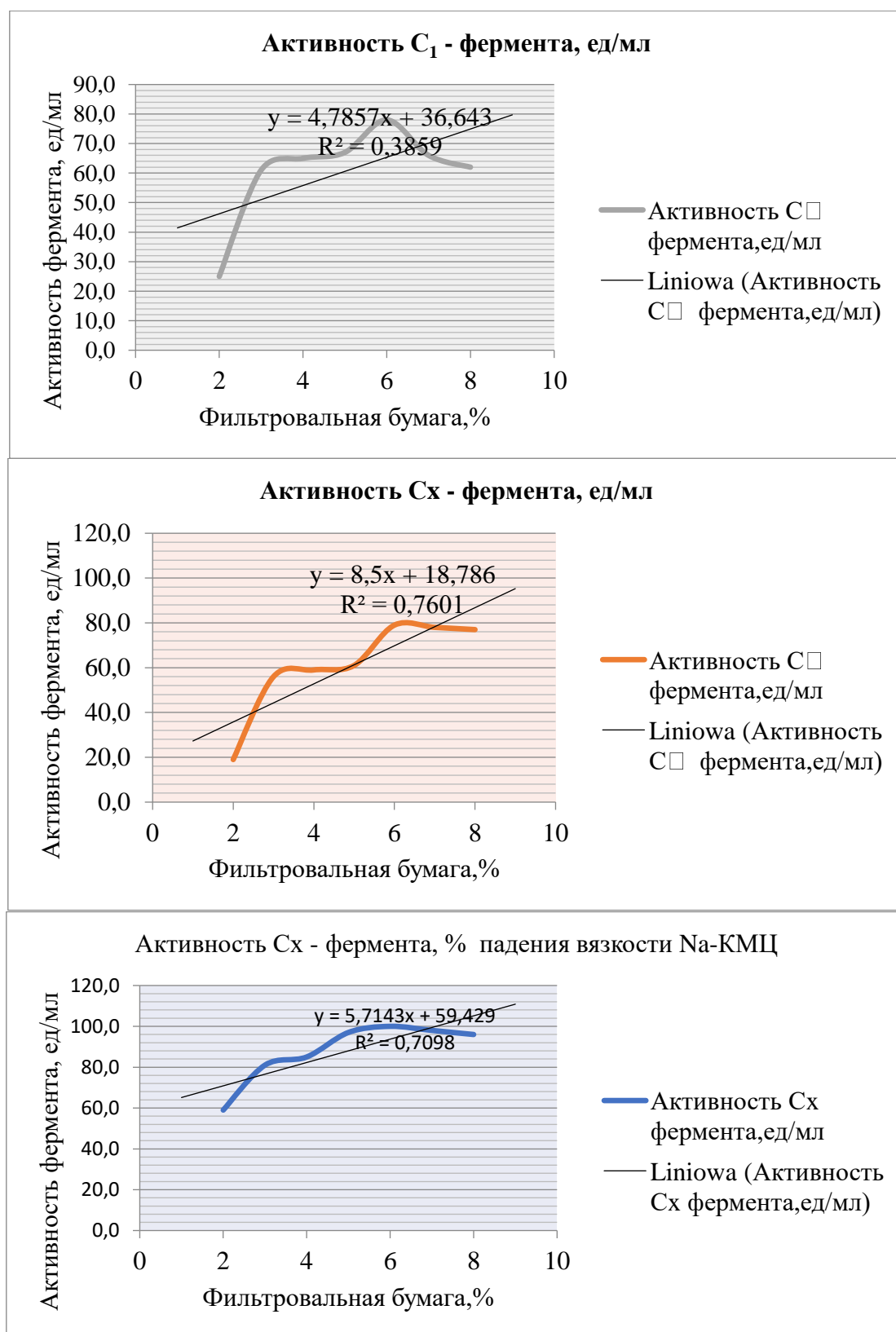


Рис. 4. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от содержания в среде клетчатки.

В опытах по изучению влияния концентрации клетчатки (фильтровальной бумаги) в питательной среде на рост гриба и биосинтез целлюлолитических ферментов выявлено, что 3% является оптимальной концентрацией для накопления как C_1 -, так C_x -фермента. Внесение в среду клетчатки в больших количествах (3,5; 4,0%)

не привело к повышению целлюлолитической активности, при пониженном же ее содержании (ниже 2%) ферменты продуцируются в значительно меньших количествах (рис. 4).

В литературе имеются сведения о том, что при выращивании грибов для получения целлюлолитических ферментов можно применять

дешевые естественные источники клетчатки: отруби, древесные опилки, кукурузные кочерыжки и другие целлюлозосодержащие отходы.

В результате исследований нами установлена способность роста и накопления целлюлолитических ферментов при культивировании гриба в среде Чапека с 3% измельченных целлюлозосодержащих субстратов: пшеничная, рисовая, ржаная солома и стебли джугары. Наибольшая целлюлолитическая активность гриба проявляется на среде с пшеничной соломой по сравнению с другими источниками клетчатки. Отмечено, что активность целлюлолитических ферментов, образующихся на среде с пшеничной соломой, была близка активности ферментов на среде с фильтровальной бумагой (C₁-фермент 0,50-0,69, C_x-фермент 59-72 ед/мл соответственно).

Выводы: Таким образом, в результате исследований установлены оптимальные условия для культивирования гриба *Trichoderma harzianum*-25/П, способствующие активному синтезу целлюлолитических ферментов: среда Чапека-Докса с 0,5% кукурузного экстракта и 3% фильтровальной бумаги, pH 5,0; культивирование глубинное в течение 8-10 суток; температура 30-35°C. Из культуральной жидкости гриба, выращенного в выше указанных условиях, был выделен ферментный препарат целлюлазы путем осаждения этанолом (на 1 объем культуральной жидкости – 4 объема этанола при плюс 2-3°C). Препарат фермента представляет собой желтоватый кристаллический порошок. Активность его на 1 г препарата составляет: по C₁-ферменту 392 ед.; по C_x-ферменту 35600 ед.; удельная активность (в ед. на 1 мг белка) по C₁-ферменту – 3,1, по C_x-ферменту – 200,1. Выход препарата составил 3,50 г на 1 л культуральной жидкости. Изучение некоторых свойств

целлюлолитических ферментов *Trichoderma harzianum*-25/П показало, что для действия C₁-фермента оптимальное pH-4,5, для C_x-фермента pH-5,0. При повышении pH в зоне 5-6 для C₁-фермента и 6-7-для C_x-фермента происходит спад активности ферментов. Следовательно, оптимум pH действия C_x-фермента совпадает с оптимумом pH роста гриба, а C₁-фермента близок к оптимуму pH роста. Оптимальной температурой для действия C₁-фермента является 40°C, активность C_x-фермента максимально проявляется при 60°C. Следовательно, температурный оптимум действия целлюлолитических ферментов на 10-30°C выше по сравнению с температурным оптимумом роста гриба.

Список литературы:

1. Бондарь П.Н. Штаммы грибов рода *Trichoderma* Pers(Fr.) как основа для создания препаратов защиты растений и получения кормовых добавок. Ав. дис. на соис. уч. ст. кан. биол. наук. Москва. 2011. ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет»
2. Байбаев Б.Г., Мухаммадиев Б.К., Хамидов Д., Азимова Н. Аминокислотный состав белка гриба *Trichoderma harzianum*-UzCF 34 в культуральной жидкости. Вестник Аграрной науки Узбекистана, 2013 г., №2 (52), стр.42-44
3. Мухаммадиев Б.К. Повышение питательной ценности силоса при помощи гриба *Trichoderma harzianum*-25/П. I Международная научно-практическая Интернет-конференция, 29 февраля 2016 г. -с. Соленое Займище, Россия. стр.2991-2997.
4. Мухаммадиев Б.К. Рост мицелиальных целлюлозоразрушающих грибов *Fusarium solani* и *Trichoderma harzianum* в глубинной культуре. Вестник Прикаспия, Россия, №4 (15). 2016 г., стр 37-40.

УДК: 599.735.51

ГРНТИ: 34.35.15: ОРГАНИЗМ И СРЕДА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕСНЫХ БИЗОНОВ ПРИ ВОЛЬЕРНОМ СОДЕРЖАНИИ В УСЛОВИЯХ ПИТОМНИКА «УСТЬ-БУОТАМА»

Петров Айсен Аялович

Студент биологического отделения

Института естественных наук,

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К.Аммосова,
г.Якутск.

Кривошапкин Александр Анатольевич

Доцент Биологического отделения

Института естественных наук,

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К.Аммосова,
г.Якутск

FUNGI STRAIN OF THE TRICHODERMA HARZIANUM-25/P PRODUCER OF CELLULOLITIC ENZYMES

B.Q.Mukhammadiyev, R.D.Muminova

Tashkent State Agrarian University,

University str., 2, Tashkent 100140, Uzbekistan