

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. [Dosphegov 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)

<sup>1</sup>**Б.К.Мухаммадиев,**

к.б.н., доцент,

<sup>2</sup>**Р.Д.Муминова,**

к.с/х н.

<sup>1,2</sup>*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 °C.

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

**Введение:** За последние годы изучены многие представители грибов, производящие целлюлолитические ферменты. Однако относительно целлюлолитической активности *Trichoderma harzianum* данных в литературе мало. Имеющиеся сведения касаются активности термотolerантных 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<sub>1</sub> и C<sub>x</sub>-ферментов. Активность C<sub>1</sub>-фермента, гидролизующего нативную целлюлозу, определяли по количеству растворимых сахаров, образовавшихся при действии фермента на хлопковое волокно. За единицу активности C<sub>1</sub>-

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

Активность C<sub>x</sub>-фермента, действующего на растворимые производные целлюлозы, определяли вискозиметрическим методом по падению вязкости 0,3%-ного раствора Na-KМЦ и по количеству редуцирующих сахаров, образовавшихся при гидролизе 1%-ного раствора Na-KМЦ под действием культуральной жидкости. Культуральную жидкость перед определением активности разводили фосфатным буфером в 50 раз. За единицу активности C<sub>x</sub>-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<sub>1</sub>-фермента достигает максимума на 8 сутки культивирования. Активность C<sub>x</sub>-фермента максимально проявляется на 10 сутки, а затем происходит медленный спад активности ферментов (рис.1).

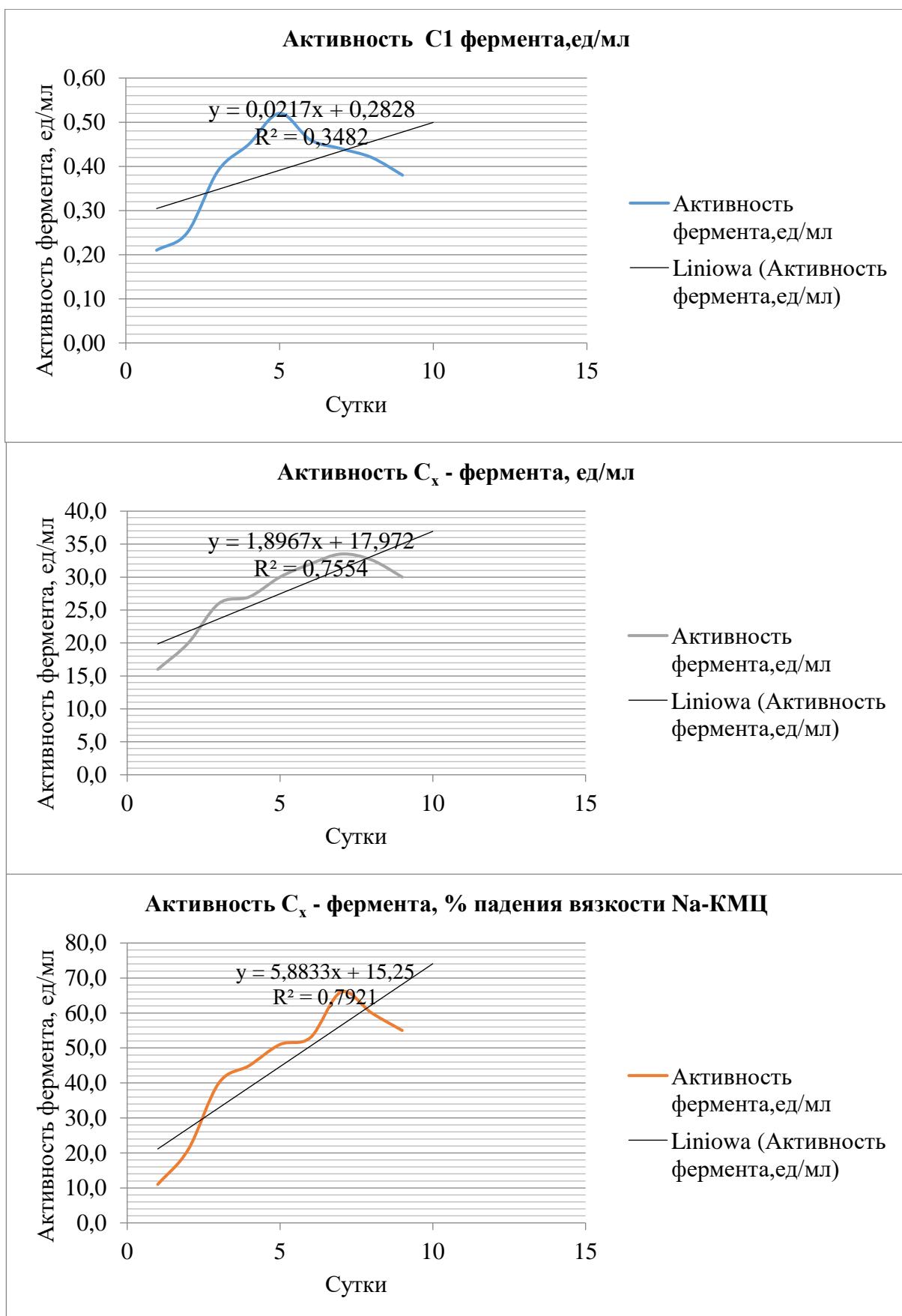


Рис.1. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от срока культивирования: 1-активность С<sub>1</sub>-фермента, ед/мл; 2-активность С<sub>x</sub>-фермента, ед/мл; 3-активность С<sub>x</sub>-фермента, % падения вязкости 0,3% Na-КМЦ;

Различие в сроке накопления ферментов, очевидно, связано с тем, что С<sub>1</sub>-фермент

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

Развитие гриба в питательной среде сопровождается изменением рН 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.

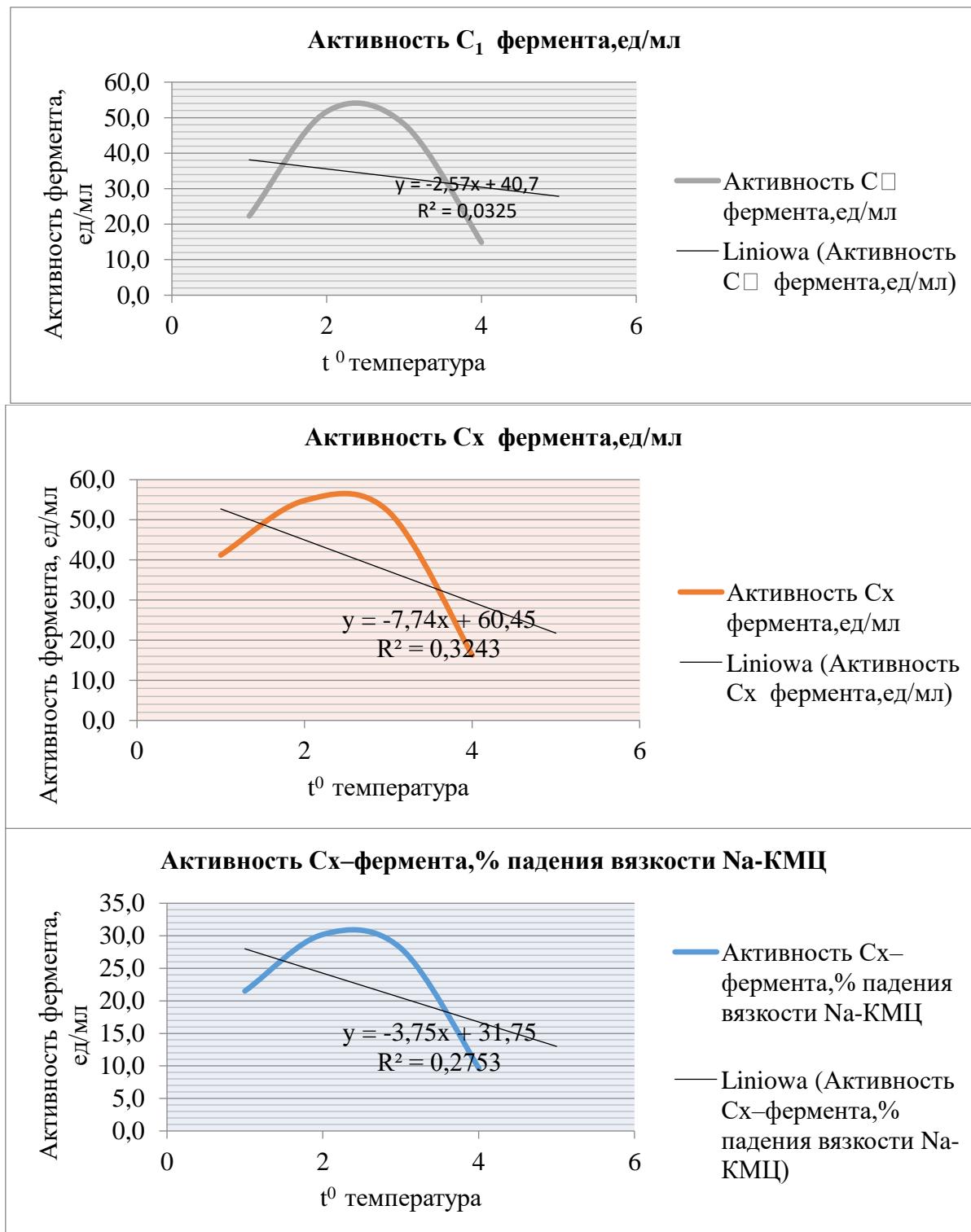


Рис.2. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от температуры культивирования.

При выращивании гриба в питательной среде с различным исходным значением рН (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).

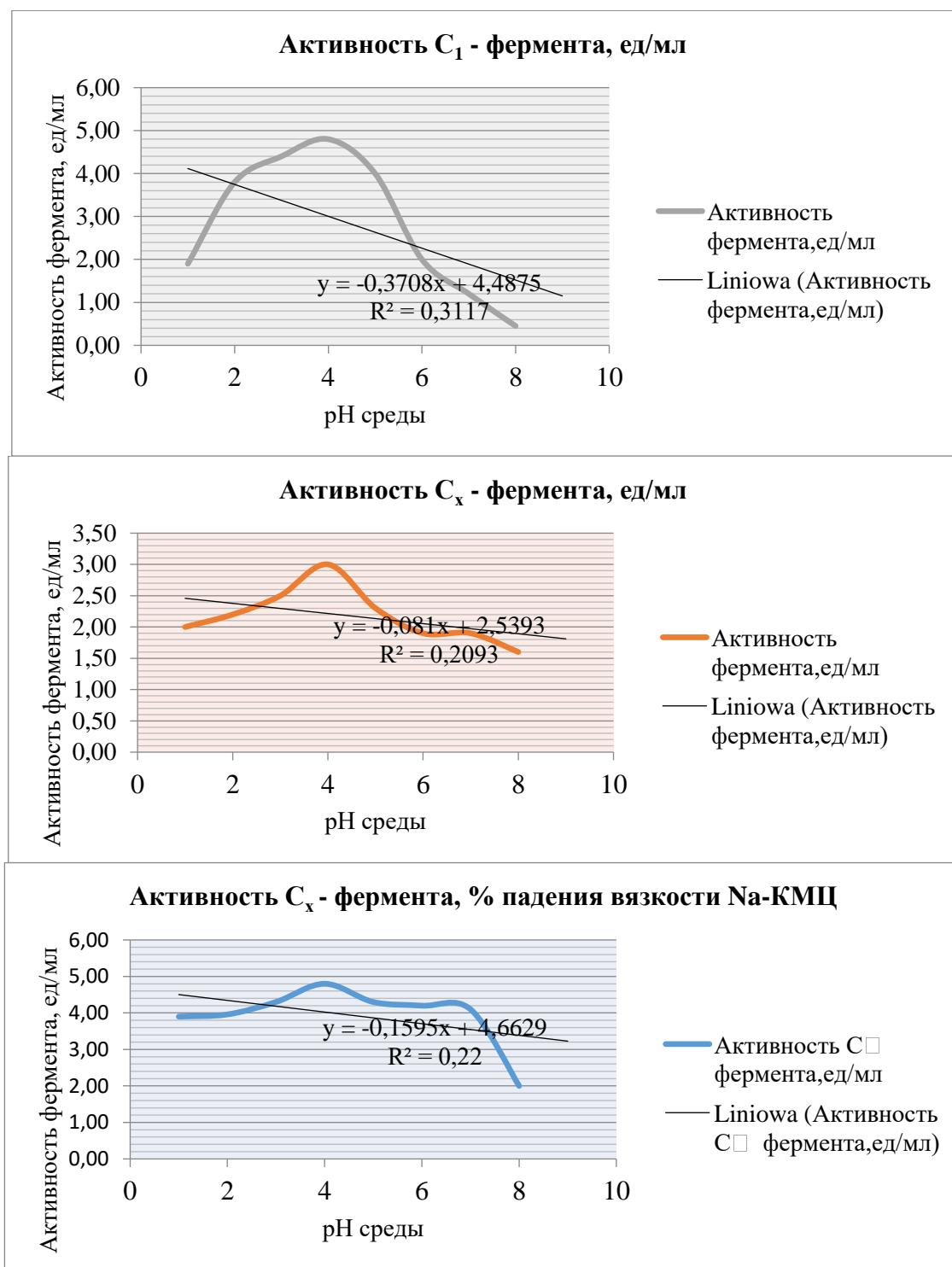


Рис.3. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от исходного значения pH среды.

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  $\text{NaNO}_3$  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.

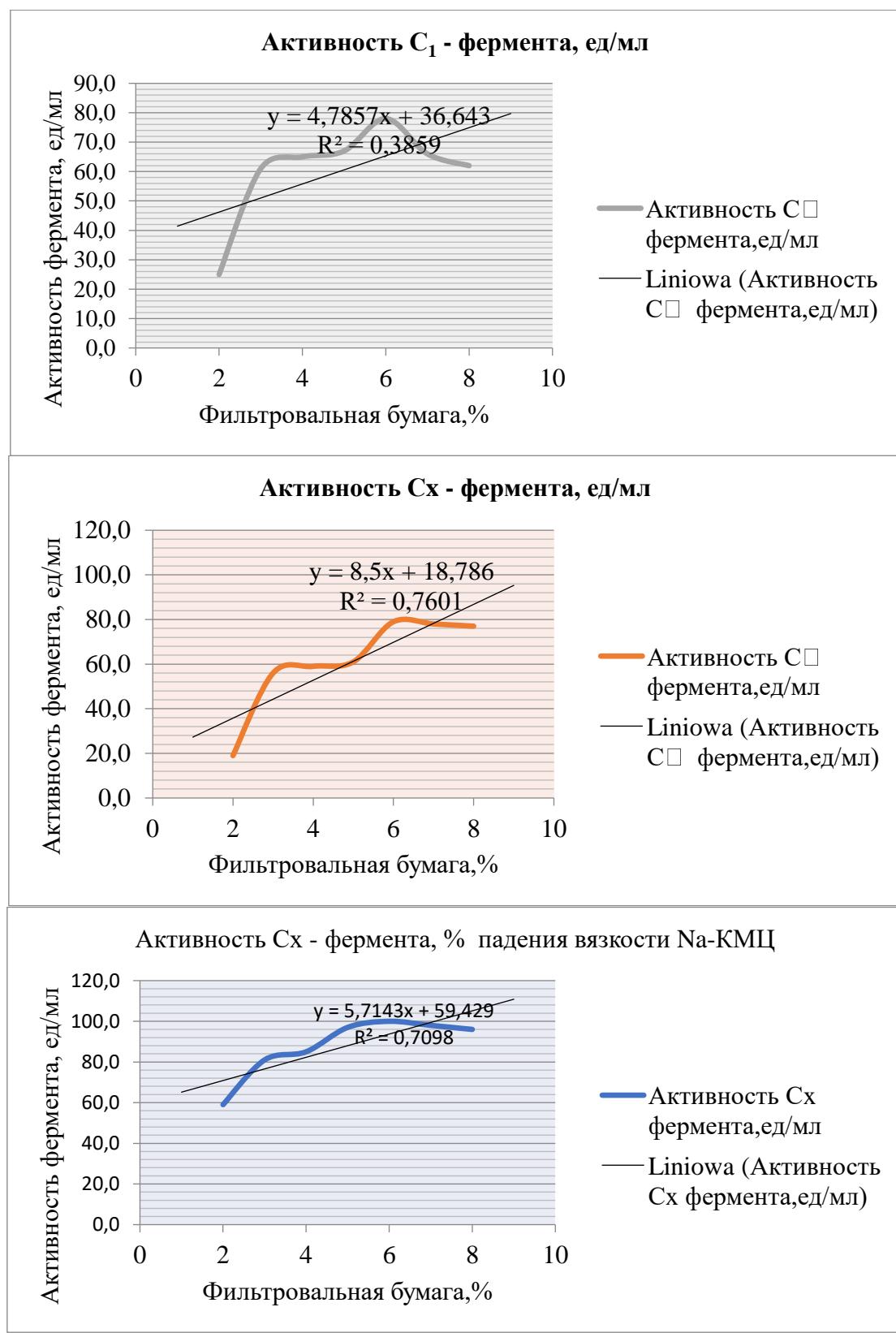


Рис.4. Целлюлолитическая активность культуральной жидкости гриба в зависимости от содержания в среде клетчатки.

В опытах по изучению влияния концентрации клетчатка (фильтровальной бумаги) в питательной среде на рост гриба и биосинтез целлюлолитических ферментов выявлено, что 3% ое являются оптимальной концентрацией для накопления как С<sub>1</sub>-, так С<sub>x</sub>-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 ( $C_1$ -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). Препарата ферmenta представляет собой желтоватый кристаллический порошок. Активность его на 1 г препарата составляет: по  $C_1$ -ферменту 392 ед.; по  $C_x$ -ферменту 35600 ед.; удельная активность (в ед.на 1 мг белка) по  $C_1$ -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  $C_1$ -фермента оптимальное pH-4,5, для  $C_x$ -фермента pH-5,0. При повышении pH в зоне 5-6 для  $C_1$ -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  $C_1$ -фермента близок к оптимуму pH роста. Оптимальной температурой для действия  $C_1$ -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:

- 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»
- 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
- 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.
- 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.Mukhammadiev, R.D.Muminova**

Tashkent State Agrarian University,  
University str., 2, Tashkent 100140, Uzbekistan