

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЗАСОРЕННЫХ
ПОЧВ СЫРДАРЬИНСКОЙ ОБЛАСТИ**

¹Ахмедова З.Р., ²Хамраева З.Т., ³Яхяева М.А., ⁴Т.Э.Шонахунов, ⁵Н.Т.Рашидова
^{1,2,3,4}Институт микробиологии АН РУз, г. Ташкент, ул.А.Кадири-7Б, akhmedovazr@mail.ru
⁵Джизакский политехнический институт, г.Джизак

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8353162>

Аннотация. *Определен степень засоленности и содержание солей в составе засоренных почв и заброшенных земель Сырдарьинской области. Изучены целлюлолитические ферменты грибов, выделенные из данных засоренных почв, относящиеся к роду *Penicillium*, разлагающие целлюлозные субстраты различного происхождения. Активности ферментов были различными в зависимости от целлюлозных субстратов - натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, древесной и хлопковой, а также микрокристаллической целлюлозы. Активности эндоглюканазы, авицелазы и целлобиогидролазы и образование белка в культуральной среде роста грибов были разными в зависимости от вида субстратов и времени культивирования грибов. Оказалось, что гриб *Penicillium* sp.8 был активнее в сравнении с культурой *Penicillium* sp.4. Обнаруженные свойства изучаемых грибов могут служить потенциальным источником получения целлюлаз и биопрепаратов с гидролитической активностями в области биотехнологии.*

Ключевые слова: *почва, степень засоленности, содержание, сумма токсичных солей, микромицеты, *Penicillium*, целлюлоза, субстраты, . активность, белок, источники ферментов, биопрепараты*

Abstract. *The degree of salinity and salt content in the composition of weedy soils and abandoned lands of the Syrdarya region were determined. Cellulolytic enzymes of fungi isolated from these weedy soils, belonging to the genus *Penicillium*, decomposing cellulose substrates of various origins, were studied. Enzyme activities were different depending on cellulose substrates - sodium salt of carboxymethyl cellulose, wood and cotton and microcrystalline cellulose. The activities of endoglucanase, avicelase, and cellobiohydrolase and the formation of protein in the culture medium of fungal growth were different depending on the type of substrates and the time of cultivation of fungi. It turned out that the *Penicillium* sp.8 fungus was more active in comparison with the *Penicillium* sp.4 culture. The discovered properties of the studied fungi can serve as a potential source for obtaining cellulases and biological preparations with hydrolytic activities in the field of biotechnology.*

Keywords: *soil, degree of salinity, content, amount of toxic salts, micromycetes, *Penicillium*, cellulose, substrates, . activity, protein, sources of enzymes, biological preparations*

Введение. В мире растет интерес к созданию высокоэффективных биотехнологий за счет использования больших объемов ежегодно возобновляемых растительных отходов различных отраслях сельского хозяйства и промышленности. Особое внимание уделяется разработке конкурентоспособных технологий, направленных на переработке растительных отходов, увеличивающиеся до более чем 10¹³ млн.тонн в год, а также выпуска продукции, альтернативной к энергетической, химической и нефтеперерабатывающей промышленности. Ибо, целлюлозосодержащие (ЦЛЗ) отходы сельскохозяйственных растений, в составе которых более 40 % целлюлозы, являются ценным источником

получения биокормов, полисахаридов, ферментов, углеводов, аминокислот, миколлипидов и целый ряд ценных продуктов микробиологически-ферментативной конверсии. Поэтому, является важным и актуальным изучение местных штаммов почвенных микромицетов, широко распространенных в природных источниках и стресс условиях, а также их использование на практике.

Весьма широка группа почвенных грибов, основное местообитание которых – почва, участвующие в разложении (минерализации) органического вещества, разложении различных химических веществ, включая и пестициды, соли, образовании гумуса и т. п. В природных местообитаниях, близки к ним грибы, разрушающие лесную подстилку: опавшие листья, гнили. К ним относятся также бактерии, микроскопические и шляпочные грибы – подстилочные сапротрофы и некоторые другие [1]. В группах почвенных грибов выделяются постоянно: обитатели почвы – грибы, попадающие туда только в определенный период жизни, благоприятных для их жизнедеятельности, включая также патогенные для животных и растений, а также грибы ризосферы растений, живущие в зоне их корневой системы. Особую группу составляют ксилофиты – грибы, разлагающие древесину [2], среди них различают разрушителей живой древесины и питающиеся мертвой древесиной (опавшие сучья, порубочные остатки и т. п.).

Бурный интерес к целлюлазам вызвано и тем, что данные ферменты микробного происхождения успешно используются в процессах гидролиза целлюлозы, которые используются в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства – деревообрабатывающей (для отделения целлюлозы), хлопкоочистительной (для увеличения выхода и улучшения качества волокон), целлюлозно-бумажной (получения бумаги высших сортов), текстильной (для расшлихтовки тканей и увеличении длины целлюлозных нитей), пищевой (для получения соков, коктейлей, лекарственных препаратов, волокон-биодобавок), в кормопроизводстве (получения грубых и обогащенных кормов для вскармливания сельскохозяйственным животным и птицам, улучшения пищеварения, снижения заболеваемости и др.), экологической биотехнологии (для утилизации промышленных, бытовых, растительных отходов и др.) [3].

Особый интерес для создания промышленного производства ферментов представляют солеустойчивые, термо толерантные микроорганизмы, в том числе актиномицеты-продуценты литических ферментов, которые обладают высокой скоростью роста и устойчивостью к изменениям температуры культивирования. Также важно, что термо толерантные культуры часто оказываются более конкурентоспособными по сравнению с мезофильными продуцентами в отношении микрофлоры.

Целлюлазы могут конкурировать обладая биологической эффективностью против фитопатогенов и вредных насекомых, наравне с известными биоцидными препаратами. В отличие от них они могут обладать стимулирующей и фитотоксичной активностью, только с некоторыми различиями. Во всем мире ведутся работы по созданию индукторов устойчивости, фитотоксическим свойствам, благодаря антагонистической активности, особенно при ферментативном катализе конверсии целлюлозы [5].

Исходя из этого, в данной работе приводятся данные, полученные при изучении целлюлолитических ферментов почвенных грибов, относящиеся к роду *Penicillium*,

р
а
з
л
а
г
а

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали культуры микроскопических грибов рода *Penicillium*, выделенных из засоренных пестицидами и засоленных почв заброшенных земель Сырдарьинской области. . Культуры хранили на агаризованной среде сусло-агар и Чапек-агар.

Культивирование грибов осуществляли ГЛК способом в жидкой модифицированной питательной среде Чапека-Докса, где в качестве единственного источника углерода использовались микрокристаллическая целлюлоза.

Для засева питательной среды, использовали мицелий грибов, выращенная на жидкой питательной среде.

Оптимизацию состава питательной среды и других параметров проводили при температуре 28°-32°С в конических колбах Эрленмейра объемом 1 л с 200-300 мл питательной среды, при рН 5,6-6,0 в зависимости рода грибов в течение 3-15 суток в зависимости от появления и накопления максимального количества белка, ферментативной активности, на круговых качалках, со скоростью вращения 250 об/мин. Водородный показатель (рН) питательной среды для культивирования продуцентов поддерживали на уровне 5,7-6,0.

Методы определения роста и контроля культур: скорости роста грибов определяли по накоплению биомассы в г/100 мл культуральной среде (КС) и накопления белка в культуральной среде выращивания. .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение состояние почвы засоренных и заброшенных земель Сырдарьинской области, из которой были выделены микроскопические грибы показали, что данная почва относится к сильно засоленной почвам сульфатного типа, в которой рН-8,1, степень засоленности -9,2 **dS/m**, сумма токсичных солей составила 0,473 % (табл.1).

Таблица-1 . Агрохимический анализ засоренной почвы Сырдарьинской области

Место отбора образцов почвы	Степень засоленности по Есе, dS/m	Оценка степени засоления по Есе, тип засоления	рН	Показатель	Норма рН почвы
Сырдарьинская область, почва засоренных-заброшенных земель	8,92	Сильно засоленная почва сульфатного типа	8,1	Сильно засоленная, щелочная	5,0-5,5

Из обнаруженных почвенных мицелиальных грибов, наибольший интерес представляет грибы рода *Penicillium*. Поэтому, методами ПВК грибов на целлюлозосодержащей среде, внесенный в состав питательной среды в качестве единственного источника углерода (2,0-5,0%) были оценены гидролитические активности грибов *Penicillium* sp.8 и *Penicillium* sp.4.

Сериями экспериментов глубинного культивирования на целлюлозосодержащей среде по скорости роста в течение 3-7 суток на среде с (МКЦ) в сравнительном аспекте была изучена активности двух штаммов гриба *Penicillium*.

Было обнаружено различия по накоплению белка в КЖ и активностей ферментов целлюлолитического комплекса.

При изучении сравнительной активности, было обнаружено, что активность эндоглюканазы (ЭГЗ) по гидролизу NaKMЦ была высокой на среде с МКЦ у гриба *Penicillium* sp.8, чем *Penicillium* sp.4 (табл.2)

Таблица- 2.

Эндоглюканазная активность грибов в зависимости от времени роста

Микромицеты-грибы	Время роста, часы					
	48	72	96	120	144	168
Эндоглюканазная активность, ед/мл						
<i>Penicillium</i> sp. 4	1,45±0,18	1,26±0,13	2,1±0,01	3,5 ±0,01	4,96±0,2	6,77±0,15
<i>Penicillium</i> sp. 8	3,8±0,05	4,17±0,07	4,1±0,06	5,37±0,14	6,68 ±0,1	8,79±0,14
Авицелаза, гидролизующие древесную целлюлозу						
<i>Penicillium</i> sp.8	-	0,95±0,2	0,5±0,02	0,1±0,01	1,01±0,03	1,85±0,17
<i>Penicillium</i> sp.4	0,71±0,02	2,45±0,05	2,87±0,04	2,87±0,03	3,06±0,08	3,27±0,07
Целлобиогидролазная активность грибов						
<i>Penicillium</i> sp.8	0,73±0,02	1,35±0,03	2,04±0,03	2,01±0,16	1,97±0,02	2,59±0,03
<i>Penicillium</i> sp.4	0,83±0,01	1,62±0,06	2,05±0,05	2,92±0,06	3,01±0,12	3,44±0,3

Показано, что активность эндоглюканазы (ЭГЗ) по гидролизу NaKMЦ была высокой на среде с МКЦ у гриба *Penicillium* sp.8, чем культура *Penicillium* sp.4

Тогда как формы целлюлазы, гидролизующие древесную целлюлозу, были высокими у гриба *Penicillium* sp.8 менее у *Penicillium* sp.4. Грибы проявляли стабильные активности, характерную истинным целлюлозолитикам, активность целлобиогидролазы по гидролизу МКЦ была высокой у гриба *Penicillium* sp.8 уже на 3 сутки роста.

Установлено, что из испытуемых грибов сравнительно активным оказался гриб *Penicillium* sp 8. (Табл. 2)

Далее, было определено количество белков, образующиеся в динамике их роста в течение 144 часов роста в культуральной среде (табл.-3). Образование белка в КЖ начинается с 24 часов роста, достигая высокого уровня на 7-10 сутки и различается, в зависимости от целлюлозного субстрата, внесенный в состав питательной среды в качестве единственного источника углерода.

Таблица -3

Образование белков в динамике роста отобранными грибами в среде с МКЦ

Культуры	Время культивирования, сутки					
	2	3	4	5	6	7
Накопление белка в КС грибов на среде с МКЦ (2,0 %), мг/мл						
<i>P</i>	0.32±0.02	0.49±0.02	1.27±0.07	2.18±0.3	2.16±0.3 6	3.13±0.5 6
<i>Penicillium</i> sp.8	0.42±0.02	0.76±0.06	0.91±0.07	2.39±0.5	2.35±0.6 3	3.33±0.3 6

Накопление большего количества белка наблюдается у гриба *Penicillium* sp.8 в количестве 3,33 мг/мл, а у *Penicillium* sp. 4 составила 3,13 мг/мл культуральной среде.

Как видно из данных развернутой таблицы-4, активности грибов были разными в зависимости от времени культивирования и вида грибов. Наибольшую активность проявлял *P*

e *C*

Таблица -4.

Целлюлазы грибов на различных субстратах в динамике роста

c

ò

б

н

ò

Культуры	Время культивирования, сутки					
Дни роста	2	3	4	5	6	7
Целлюлолитическая активность по гидролизу 2,0 % - NaКМЦ, ед/мл						
<i>P</i>	0,52±0.02	0,83±0.03	1,54±0.02	1,78±0.06	1,84±0.41	2,63±0.23
<i>P</i>	1,26±0.09	0,63±0.04	0,52±0.06	0,052±0.0008	0,51±0.01	0,31±0.01
Целлюлолитическая активность по гидролизу древесной целлюлозы, ед/мл						
<i>P</i>	0,12±0.06	0,21±0.04	0,65±0.022	0,72±0.01	0,82±0.06	0,85±0.06
<i>P</i>	0,37±0.01	0,41±0.01	0,47±0.021	0,48±0.08	0,66±0.016	0,45±0.019
Целлюлолитическая активность по гидролизу хлопковой целлюлозы, ед/мл						
<i>P</i>	0,97±0.13	0,77±0.025	0,82±0.013	0,92±0.021	0,95±0.1	1,12±0.04
<i>Penicillium sp. 4</i>	0,71±0.09	0,55±0.036	0,78±0.016	0,83±0.11	0,91±0.011	1,02±0.22

Скорости гидролиза высококристалличной, трудногидролизуемой древесной

ц

е Аналогичную картину наблюдали при гидролизе хлопковой целлюлозы, активным

п

к Таким образом, культуры двух грибов, выделенные из засоленной почвы Бирдарьинской области, засоренные также токсичными солями обладали способностью гидролизировать целлюлозные субстраты, отличающиеся по структуре, свойствам и

н

р

ы

я В настоящее время промышленность суверенной Республики Узбекистан остро нуждается в ферментных препаратах. Продуктивность процесса образования активных ферментов со стороны мицелиальных грибов, прежде всего целлюлаз, можно регулировать путем изменения состава питательной среды используя в качестве углеродного питания различные целлюлозные субстраты.

б

Эффективность энзиматической обработки целлюлозных субстратов различного происхождения зависит от компонентного состава ферментов и их активностей, особенно в производственных условиях и при приготовлении коммерческих форм всех представителей ферментов, что следует учесть производственные требования и соответствие свойств отдельных их форм [4].

к

В результате проведенных исследований нами была изучена сравнительная оценка целлюлолитические активности грибов *Penicillium sp.8* и *Penicillium sp.4*, активно разлагающие трудногидролизуемые полисахариды - целлюлозы. Особую ценность имеет активности культур, гидролизующие хлопковую целлюлозу, отличающиеся от других субстратов высокой индексом кристалличности, степенью полимеризации, нерастворимостью в воде и трудно гидролизуемостью. .

и

Полученные в рамках данной работы данные, в частности гриб *Penicillium sp.8* могут служить источником создания биопрепаратов с гидролитическим действием, (рис. 1) имеют ценное значение в биотехнологии,

я

б

а

р

е

REFERENCES

1. El-Tarabily K. A, Hardy G. E. St. J, Sivasithamparam K. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* (2000) 49, 573-583.
2. Марьиновская, Ю.В. Севастьянова Н.Н. Микробиологическая деструкция целлюлозосодержащих отходов // *Микробиология*. – 2006. – №3. – С. 75 – 81.
3. Z.Axmedova, N.Rashidova. Enzymatic activity of wood degrading -basidiomycetes *Pleurotus ostreatus UzBI-105* in the various carbon sources. *Spectrum Journal of Innovation, Reforms and Development*, 6, Volume 06, Berlin,Germany, Aug, 2022. P.87-91, ISSN (E): 2751-173, Website: www.sjird.journalspark.org.
4. N.Rashidova, Z.Axmedova. Robtaining biotechnological products based on enzymatic conversion of plant waste. *Хоразм Маъмун академияси ахборотномаси: илмий журнал*.- №6/1 (102), ISSN 2091-573 X Хоразм Маъмун академияси, 2023 й. – 232 б. – 38-41б. <http://mamun.uz/uz/page/56>.