

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ**

На правах рукописи

УДК 577.153.2

САТТАРОВ МУЗАФФАР ЭШТЕМИРОВИЧ

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЛЮЛАЗ *ASPERGILLUS
TERREUS 9* И *PLEUROTUS OSTREATUS* УЗБИ-И105**

03.00.23-биотехнология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Ташкент – 2010

Работа выполнена в лаборатории ферментов микроорганизмов Института микробиологии Академии Наук Республики Узбекистан

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Ахмедова Захро Рахматовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ахунов Али Ахунович

кандидат технических наук **Атаханов Абдумутолиб Абдупатто угли**

Ведущая организация: Институт химии растительных веществ им. акад. С. Юнусова АН РУз

Защита состоится « _____ » _____ 2010 г. в _____ ч. на заседании Специализированного Совета Д. 015.02.01 по присуждению ученой степени доктора биологических наук при Институте микробиологии АН РУз по адресу: 100128, г. Ташкент, ул. А. Кадыри 7^б.

Телефон: (+99871) 244-25-19, факс: (+99871) 244-25-82

E-mail: imbasru@uzsci.net

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института микробиологии АН РУз.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2010 г.

Ученый секретарь
Специализированного Совета
кандидат биологических наук

С.М. Насметова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Повышенный интерес к созданию высокоэффективных биотехнологий, основанных на использовании ежегодно возобновляемого растительного сырья, вызван целым рядом обстоятельств. Прежде всего, это ощущаемое истощение ископаемых источников органического сырья. Растительная биомасса, запасы которой на земле по оценкам экспертов, составляют более 10^{13} тонн/год, рассматривается в качестве альтернативы нефти в энергетике, химической промышленности и других отраслях. Кроме того, не пищевое растительное сырьё (солома, гузапая, отходы древесины и другие целлюлозосодержащие отходы сельского хозяйства и промышленности) является перспективным источником для получения кормов, полисахаридов, а также разнообразных продуктов микробиологического синтеза.

Все эти технологии связаны с переработкой целлюлозосодержащих растительных материалов, которые осуществляются либо с помощью кислотного гидролиза, либо микробных ферментов. Основным недостатком кислотного гидролиза целлюлозосодержащих субстратов – большая энерго- и материалоемкость, а также жесткие условия, которые приводят к частичному разложению образующихся низкомолекулярных соединений и загрязнению их примесями, токсичными как для микроорганизмов (при последующей ферментации), так и для окружающей среды, особенно для работников. Следовательно, оптимальным для гидролиза целлюлозосодержащих субстратов (ЦС) является ферментативный гидролиз. Хотя в мире известно несколько десятков ферментов с целлюлолитической активностью, производственный способ разложения ЦС с их помощью пока не налажен. Главной причиной этого является гетерогенность, невысокая активность и низкая стабильность известных ферментов в производственных условиях.

Для основной отрасли сельского хозяйства Узбекистана – хлопководства крайне необходимо увеличение ассортимента экологически безопасных природных препаратов микробного происхождения, эффективных в различных стадиях их развития. Все это делает необходимым детальное исследование не только активных культур микроорганизмов, но и продуктов их жизнедеятельности, в частности целлюлолитических ферментов и их молекулярных форм различной степени чистоты и разработку условий их эффективного применения.

Данная диссертационная работа посвящена изучению целлюлазной активности грибов: микромицетов и базидиомицетов. Представлены данные по подбору оптимальных условий биосинтеза, процедуре очистки и характеристике синтезируемых ими основных форм ферментов, а также рекомендации по применению очищенных ферментов.

Степень изученности проблемы. Известно, что активными продуцентами целлюлазы в основном являются мицелиальные грибы [Бухтияров Ф.Е. и др., 1999; Рабинович М.Л. и др., 2002]. В настоящее время большое внимание

уделяется проблеме биодegradации лигнина – одного из самых устойчивых к химическому и микробиологическому разложению биополимеров [Королева О.В., Степанов Е.В., и др. 2007]. В то же время, лигнин активно разрушается макроскопическими грибами [Maclachlan G., Wong Y.-S., 1979., Ахмедова З.Р., 1999; Леонтьевский А.А., 2002], что даёт возможность использовать их совместно в биотехнологических процессах, связанных с получением ценных для народного хозяйства препаратов.

Помимо традиционных биотехнологий (утилизации растительных отходов с целью получения сахаристых веществ и биотоплива), целлюлазы различного происхождения рекомендуются для использования при ферментативном орошении семян хлопчатника [Юлдашев Б.Т. и др., 1986, Назаров К.К., 2007]. Но эти работы не нашли своего дальнейшего развития из-за отсутствия очищенных форм ферментов и ферментных препаратов с соответствующей субстратной специфичностью. В то же время, при изучении целлюлаз местных штаммов микромицетов и базидиомицетов, практические приемы их совместного использования не разработаны.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Работа выполнена в соответствии с планом НИР Института микробиологии АН РУз по проекту П-13-56 «Биодegradация растительных отходов базидиальными грибами» (2003-2005 гг.) и А-6-081 «Применение ферментов и их композиций в возделывании некоторых сельскохозяйственных культур» (2006-2008 гг.).

Цель исследования: Выявление высокоактивных продуцентов целлюлаз из таксономически различающихся классов грибов (микромицетов и базидиомицетов), получение очищенных препаратов целлюлаз и их сравнительная характеристика, разработка способа применения комплексного препарата целлюлаз для предпосевной обработки семян.

Задачи исследования:

1. Провести отбор среди местных штаммов микромицетов и базидиальных грибов – активных продуцентов целлюлазных ферментов.
2. Выделить и очистить целлюлазы из отобранных активных штаммов.
3. Сравнительный анализ очищенных целлюлаз активных штаммов.
4. Разработка лабораторных регламентов получения очищенных целлюлаз из культуральной жидкости изучаемых грибов.
5. Испытание очищенных ферментов и их комплекса в предпосевной обработке семян хлопчатника.

Объект и предмет исследования: Культуры штаммов сапротрофных грибов *Aspergillus terreus* 9, *Aspergillus terreus* Н, *Aspergillus niger* 20 и *Aspergillus niger* 4 и ксилотрофных грибов *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, *Inonotus hispidus* УзБИ-Т8, *Fomes fomentarius* УзБИ-Я55 и *Panus tigrinus* УзБИ-ГО 13, полученные из лаборатории ферментов микроорганизмов и коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии АН РУз.

Методы исследования. При выполнении работы использованы классические микробиологические, биохимические и физико-химические методы: скрининг штаммов грибов, отбор активных продуцентов, их

культивирование, осаждение, центрифугирование, высушивание, диализ, гель-фильтрация, ионообменная хроматография, электрофорез ферментных белков.

Гипотеза исследования. Известно, что признанными свойствами многих грибов является их способность к синтезу и секреции различных гидролитических ферментов, в том числе целлюлаз. Гипотезой данного исследования явилось то, что убиквистность целлюлаз у филогенетически далеких грибов предполагает их сходство и/или различия в структурно-функциональных, биосинтетических и каталитических свойствах, в частности, целлюлаз.

Достоверность и обоснованность. Статистическую обработку результатов исследований проводили при помощи компьютерной программы «Microsoft Excel» с использованием общепринятых статистических критериев [Лакин Г.Ф., 1990].

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Местные штаммы *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, несмотря на таксономически различающиеся положения, в идентичных условиях культивирования, в первую очередь, образуют в большом количестве эндоглюканазу.

2. По физическим, химическим и каталитическим параметрам целлюлазы из *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 имеют очень близкие свойства по рН и температурному оптимуму катализа, но различаются по молекулярной массе, удельной активности и выходу белка.

3. Очищенная эндоглюканаза *Aspergillus terreus* 9 с молекулярной массой 30 кДа обладает высокой термостабильностью, проявляя высокую активность при 50 °С.

4. Кооперативное действие очищенных форм эндоглюканаз обоих грибов, обнаруженное при обработке семян хлопчатника, приводит к увеличению их энергии прорастания, всхожести и доказывает синергизм действия целлюлаз, полученных из грибов разных классов, на гетерогенную целлюлозную оболочку семян.

Научная новизна. Впервые проведен сравнительный анализ целлюлолитической активности сапротрофных и ксилотрофных грибов и отобраны высокопродуктивные местные штаммы – *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105.

Путем разработки оптимальных способов культивирования обоих грибов на высококристаллических, трудногидролизруемых целлюлозосодержащих субстратах определены оптимальные сроки ферментообразования. Выделены и очищены основные представители целлюлаз – высокоактивные эндо-1,4-β-глюканаза, продуцируемые во внеклеточную среду. Получены гомогенные формы фермента, несколько отличающиеся между собой как по активности, выходу, молекулярной массе, так и каталитическим свойствам. Установлено, что, несмотря на идентичные условия культивирования, отобранные грибы отличаются по уровню синтеза целлюлаз и выходу ферментного белка. Таксономическая принадлежность грибов к разным классам не оказывает

влияния на сроки образования эндоглюканазы – основного представителя целлюлаз.

Впервые доказан синергетический эффект очищенных эндоглюканаз *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 на прорастание семян хлопчатника.

Научная и практическая значимость результатов исследования. В результате скрининга среди сапротрофных и ксилотрофных грибов отобраны два высокоактивных штамма: микромицет *Aspergillus terreus* 9 и базидиомицет *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. Выделены и очищены до гомогенности две формы эндоглюканазы, отличающиеся физико-химическими и каталитическими свойствами. Совместное использование очищенных форм ферментов обоих грибов в предпосевной обработке семян хлопчатника сокращает срок прорастания и увеличивает энергию всхожести, что даёт возможность в дальнейшем использовать комплексные препараты целлюлаз в хлопководстве.

Реализация результатов. Разработаны лабораторные регламенты получения очищенных эндоглюканаз из культур грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 (регламенты прилагаются).

Результаты исследований могут быть использованы при биоконверсии и утилизации растительных отходов, а также при возделывании сельскохозяйственных культур, в частности, для предпосевной обработки семян хлопчатника (акты испытаний прилагаются).

Апробация работы. Результаты исследований доложены на Республиканской конференции «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии», Ташкент (2003); III съезде микробиологов Узбекистана, Ташкент (2005); III Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва (2005); IV Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва (2007); VII Международном симпозиуме химии природных соединений, Ташкент (2007); IV съезде микробиологов Узбекистана, Ташкент (2008); III Международной конференции «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал», Пермь-Н. Новгород-Пермь (2008); V Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва (2009).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе, 3 журнальные статьи и 11 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3-х глав (обзора литературы, методов исследований, полученных результаты, и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Работа изложена на 116 страницах компьютерного текста и включает 17 рисунков и 15 таблиц. Количество использованных литературных источников составляет 137 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, определена цель, поставлены задачи исследований, а также отмечена научная новизна и практическая ценность работы.

Обзор литературы. Литературный обзор посвящен анализу современного состояния исследований по целлюлазам микроорганизмов (грибов и бактерий), представлениям о механизме гидролиза целлюлозы и применению целлюлолитических ферментов в различных отраслях народного хозяйства.

Методы исследования. Культивирование грибов микромицетов и базидиомицетов в течение 3-30 суток проводили глубинным способом на жидкой питательной среде на качалке со скоростью вращения 240 об/мин при температуре 28-30°C и pH 5,5-6,0.

При оптимизации условий культивирования использовали модифицированную среду Чапека-Докса с включением различных источников углерода: микрокристаллической целлюлозы, ксилана, пшеничных отрубей и древесных опилок в разных соотношениях. Целлюлазную и ксиланазную активность определяли методом Сомоджи-Нельсона в модификации Фениксовой Р.В. [Фениксова Р.В., 1975]. Количество белка в культуральной жидкости определяли – по Лоури [Lowry, 1951], при очистке – по Варбург-Кристиану [Досон Э. и др., 1991]. Высокоактивную культуральную жидкость лиофильно высушивали (Иней 3-2), разделяли гель-фильтрацией на TSK HW-55f, предварительно уравновешенной колонке 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,9. Очистку ферментов осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-TSK HW-650M, уравновешенной 0,01 М натрий ацетатным буфером с pH 4,9 и контролировали электрофорезом на 10%-ном ПААГ с 0,1% ДДС-Na по методам Вебера и Осборна [Weber K., Osborn M., 1969] и Лэммли [Laemmli, 1970], характеристику – по М. Диксон, Э. Уэбб [М. Диксон, Э. Уэбб, 1966].

Результаты исследований и их обсуждение

Отбор грибных продуцентов целлюлаз и ксиланаз. Микромицеты и базидиомицеты активно растут на лигноцеллюлозных субстратах и в зависимости от свойств субстрата образуют ферменты, гидролизующие целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. С целью выявления целлюлазоактивных продуцентов нами проведен качественный и количественный отбор среди местных штаммов микромицетов рода *Aspergillus* – *Aspergillus terreus* 9, *Aspergillus terreus* Н, *Aspergillus niger* 4, *Aspergillus niger* 20 и дереворазрушающих базидиомицетов – *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, *Fomes fomentarius* УзБИ-Я55, *Inonotus hispidus* УзБИ-Т8, *Panus tigrinus* УзБИ-ГО 13 по их способности накапливать в культуральной жидкости белок, целлюлазную и ксиланазную ферменты при культивировании на средах, содержащих в качестве единственного источника углерода 3 % микрокристаллическую

целлюлозу или ксилан.

При культивировании микромицетов рода *Aspergillus* на среде с целлюлозой в течение 30 суток выявлено, что максимальная целлюлазная активность наблюдалась у штаммов *Aspergillus terreus* 9, *Aspergillus terreus* Н к 12 суткам, у *Aspergillus niger* 4, *Aspergillus niger* 20 – к 18 суткам роста. При этом штамм *Aspergillus terreus* 9 отличался от остальных самой высокой целлюлазной активностью в течение всего периода культивирования. К 12 суткам роста его максимальная целлюлазная активность в культуральной жидкости составляла 11,8 ед/мл, в то время как у остальных штаммов скорость продуцирования ниже – к 12 суткам максимум активности составлял 9,7-4,9 ед/мл.

При культивировании микромицетов на среде с ксиланом штамм *Aspergillus terreus* 9 также отличался от остальных штаммов более высокой ксиланазной активностью в течение всего периода культивирования. Так, максимальное накопление ксиланаз на 12 сутки составляло 68,8 ед/мл. У остальных штаммов скорость продуцирования ниже – к 12 суткам максимум активности равнялся 36,4-58,6 ед/мл. В результате сравнительных исследований микромицетов для дальнейшего изучения отобран штамм *Aspergillus terreus* 9.

При культивировании базидиомицетов на среде с целлюлозой самыми активными продуцентами целлюлаз и белка были штаммы *Inonotus hispidus* УзБИ-Т8 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. У штамма *Inonotus hispidus* УзБИ-Т8 к 15 суткам культивирования целлюлазная активность достигала 8,4 ед/мл, накопление белка - 6,1 мг/мл. У штамма *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 активность фермента составляла – 8,3 ед/мл. К 18 суткам роста накопление белка составляло – 6,2 мг/мл, но происходило с меньшей скоростью.

При культивировании базидиомицетов на питательной среде с ксиланом наибольшая активность ксиланазы наблюдалась у штамма *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 – на 15 сутки роста 29,3 ед/мл. По сравнению с этим штаммом *Fomes fomentarius* УзБИ-Я55 продуцировал ксиланазу с несколько меньшей активностью 28,3 ед/мл. Из остальных изученных штаммов *Inonotus hispidus* УзБИ-Т8 продуцировал ксиланазу с меньшей активностью 19,8 ед/мл. Сравнительное исследование четырех местных штаммов высших грибов по продуцированию белка, целлюлаз и ксиланаз, а также по сумме удельной активности этих ферментов, позволило отобрать для последующего изучения высокоактивный штамм *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105.

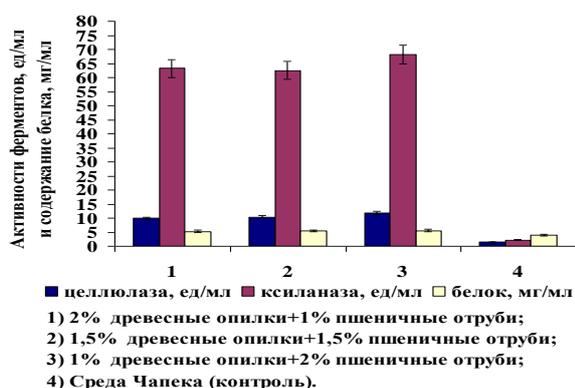
Отобранные штаммы микромицета *Aspergillus terreus* 9 и базидиомицета *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, лучше растут на ксилане, чем на целлюлозе – накапливают максимальное количество белка 7,2 и 9,2 мг/мл, при этом активность ксиланазы составляет – 68,8 и 29,3 ед/мл соответственно. При росте на среде с целлюлозой штаммы значительно меньше накапливают белок (6,8 и 6,2 мг/мл) и целлюлазу (11,8 и 8,3 ед/мл). При этом штамм *Aspergillus terreus* 9 продуцировал ксиланазу (68,8 ед/мл) в 2,3 раза выше, чем штамм *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 (29,3 ед/мл). *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 более активен

по продуцированию белка в 1,3 раза. При культивировании на среде с целлюлозой штамм *Aspergillus terreus* 9 активен по продуцированию белка почти на 9% и целлюлазы в полтора раза.

Таким образом, результаты по продуцированию базидиомицетами белка и ферментов в культуральную жидкость показали, что для всех штаммов на средах с целлюлозой и с ксиланом характерно сохранение высоких значений ферментативной активности и содержания белка, вплоть до 30 суток культивирования. Однако, штаммы отличались друг от друга по максимальному содержанию и скорости накопления в культуральной жидкости целлюлаз, ксиланаз и белка.

Подбор питательной среды для культивирования грибов и максимального ферментообразования. С целью создания экономичных биотехнологических способов получения культуральной жидкости с высокой целлюлазной активностью целесообразно осуществлять культивирование грибов на средах, содержащих различные растительные и промышленные отходы: древесные опилки и пшеничные отруби в различных концентрациях и комбинациях. Выбор данных субстратов обоснован тем, что древесные опилки являются источником в основном целлюлозы (38-45%), а пшеничные отруби – источником гемицеллюлозы (42-48%).

Для получения культуральной жидкости с более высокими показателями целлюлаз и ксиланаз, продуценты целесообразно культивировать на среде с источниками целлюлозы и ксилозы. Для этого использовали модифицированную среду Чапека-Докса, в которой в качестве источника углерода служили пшеничные отруби и древесные опилки в разных соотношениях (рис. 1 и 2).



Примечание: Т–наличие достоверных различий от показателя контрольного варианта при $P < 0,05$.

Рис. 1. Активность целлюлазы, ксиланазы и накопление белка в культуральной жидкости микромицета *Aspergillus terreus* 9 на модифицированной среде Чапека

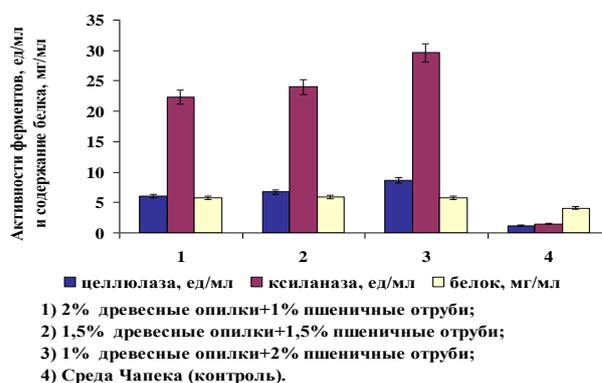


Рис. 2. Активность целлюлазы, ксиланазы и накопление белка в культуральной жидкости базидиомицета *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 на модифицированной среде Чапека

Отбирали пробы культуральной жидкости штаммов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 в течение 3-30 суток. На 12 сутки культивирования культуральная жидкость *Aspergillus terreus* 9 проявляла максимальную активность целлюлазы до 11,7 ед/мл, ксиланазы – до 68,2 ед/мл и накопление белка до 5,6 мг/мл.

На 15 сутки культивирования *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 достигалась максимальная активность целлюлазы 8,7 ед/мл, ксиланазы 29,6 ед/мл и накопление белка до 5,8 мг/мл. Полученные результаты показали, что для культивирования штаммов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 наиболее оптимальная – среда с древесными опилками – 1% и пшеничными отрубями – 2%.

Выделение и очистка целлюлаз гриба *Aspergillus terreus* 9. Для выделения и очистки фракций белков, обладающих целлюлазной активностью, использовали 12-суточную культуральную жидкость *Aspergillus terreus* 9, так как именно в этот период активность фермента достигала своего максимального уровня. Обнаружено, что исходная культуральная жидкость гриба объемом 220 мл обладала общей целлюлазной активностью 2508 единиц, которая соответствует удельной активности 2,03 ед/мг белка (табл. 1.).

Таблица 1.

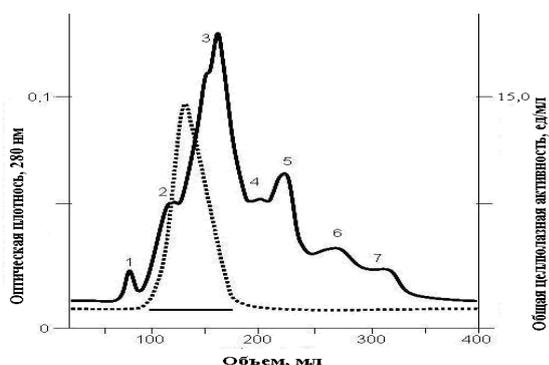
Этапы выделения и характеристика целлюлолитически активных белков из культуральной жидкости штамма *Aspergillus terreus* 9

Этап очистки	Общая активность, ед/мл	Общий белок, мг	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки, раз	Выход активности, %	Выход по белку, %
Культуральная жидкость	2508	1232	2,03	-	100	100
Сгущение на роторном испарителе	1974,8	873,75	2,26	1,11	78,7	70,92
Сефадекс G-10 (обессоливание)	1579,84	510,96	3,09	1,52	62,9	41,47
Лиофильное высушивание	1535,3	510,96	3,00	1,47	61,2	41,47
Гель-фильтрация на TSK HW-55f	1424	283,23	5,02	2,47	56,7	2,99
Лиофильное высушивание	1353,81	283,23	4,78	2,35	53,9	22,99
Ионообменная хроматография на DEAE TSK HW-650M						
фракция (I)	70,93	27,28	2,6	1,28	2,82	2,21
фракция (II)	567,47	7,68	73,89	36,4	22,62	0,624

На всех этапах очистки ферментов целлюлазного комплекса учитывали удельную активность, соответствующую выходу очищаемого белка. Данную культуральную жидкость концентрировали на роторном испарителе до объема 17 мл. Общая целлюлазная активность и концентрация белка в данном ферментном растворе была 1974,8 единиц и 873,75 мг белка, что составляет 2,26 ед/мг удельной активности фермента.

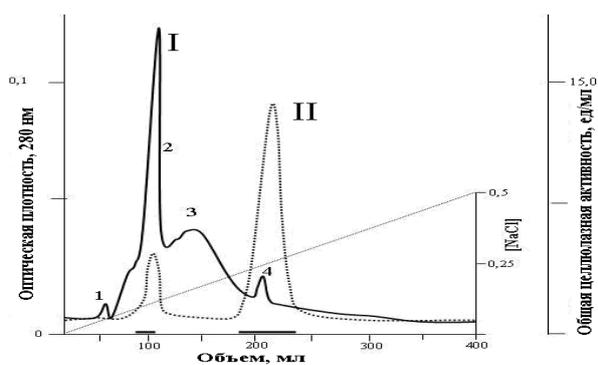
Полученный концентрат культуральной жидкости обессоливали на колонке с сорбентом Сефадекс G-10, активные фракции собирали вместе и высушивали лиофильно. Получен концентрат с повышенной удельной целлюлазной активностью до 3,09 ед/мг и содержанием белка в количестве 510,96 мг.

Для выделения и очистки фермента обессоленный и лиофильно высушенный концентрат растворяли в 2 мл 0,01 М CH_3COONa буфера с pH 4,9 и подвергали гель-фильтрации на колонке с TSK HW-55f, уравновешенной вышеуказанным буфером. Элюцию белков с колонки проводили этим буфером при скорости потока 45 мл/ч, объем фракций составлял 4 мл (рис. 3.). Как видно из рисунка, при разделении обнаружено семь белковых фракций, из которых только 2 и 3 фракции обладали целлюлазной активностью. Объединенные элюаты с максимальной активностью объемом 150 мл характеризовались содержанием 283,23 мг белка и удельной целлюлазной активностью 5,02 ед/мг. Таким образом, после гель-фильтрации получена целлюлазоактивная фракция со степенью очистки в 2,47 раза с выходом активности 56,7%. На следующем этапе очистки полученную активную вторую фракцию ГФ подвергали ионообменной хроматографии на DEAE-TSK HW-650M геле (рис. 4).



Подвижная фаза 0,01М CH_3COONa , pH 4,9; скорость потока 45 мл/ч, объем фракций – 4 мл; сплошная линия – оптическая плотность; пунктирная – активность фермента.

Рис. 3. Гель-фильтрация ферментного препарата гриба *Aspergillus terreus* 9 на TSK HW-55f



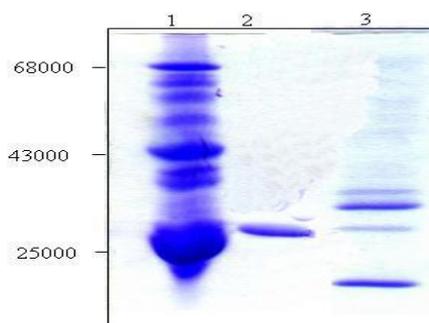
Колонка 1,6×15 см с DEAE-TSK HW-650M гелем; буфер – 0,01 М натрий ацетат, pH 4,9; линейный градиент концентрации NaCl 0-0,5М; скорость потока 30 мл/ч; объем фракций – 3 мл, сплошная линия – оптическая плотность; пунктирная – активность фермента.

Рис. 4. Ионообменная хроматография целлюлазоактивных белков *Aspergillus terreus* 9

Профиль элюации белков с колонки представлен на рисунке 4, из которого видно, что белки вымывались только в линейном градиенте NaCl в виде 4 белковых фракций. Из них только две (вторая и четвертая) обладали целлюлазной активностью и обозначены нами, как I и II целлюлазные фракции.

При анализе их активности обнаружено, что фракция I характеризуется удельной активностью 2,60 ед/мг и содержанием белка 27,28 мг. Фракция II оказалась более активной – удельная активность составляет 73,89 ед/мг, при этом содержание белка составляет всего лишь 7,68 мг.

При выделении и очистке ферментов из культуральной жидкости обычно возникает необходимость оценки эффективности этапов их выделения, концентрирования, разделения отдельных компонентов на каждой стадии очистки для удаления сопутствующих примесей белков или других ферментов, близких по молекулярной массе или по заряду и содержащихся в микроколичествах. Обычно эта задача решается использованием электрофореза с последующей идентификацией исследуемых ферментов. Поэтому фракции I и II, полученные после ионообменной хроматографии целлюлазы из гриба *A. terreus* 9, подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях на 10% ПААГе (рис. 5.).



10 % ПААГ; проявитель Кумасси голубой; 1 – стандартные маркеры, 2 – фракция II, 3 – фракция I.

Рис. 5. Электрофорез целлюлазоактивных фракций I и II *Aspergillus terreus* 9 в сравнении со стандартной смесью белковых маркеров

Из рисунка видно, что фракция I состоит из 4 белковых компонента, а фракция II оказалась электрофоретически гомогенным белком. По интенсивности окрашивания Кумасси голубым и по подвижности в сравнении с метчиками белков установлено, что 4 белковых компонента фракции I имеют молекулярные массы от 17 до 35 кДа. Фракция II представляла собой белок с молекулярной массой 30 кДа. Степень его очистки составляет 36,4 раза, выход по активности – 22,62%, содержание белка – 7,68 мг.

Эти данные свидетельствуют о том, что при подобранных нами условиях культивирования штамм гриба *Aspergillus terreus* 9 способен синтезировать множество молекулярных форм внеклеточной целлюлазы (эндо-1,4-β-глюканазы).

Таким образом, из культуральной жидкости штамма *Aspergillus terreus* 9 выделены и очищены две формы внеклеточной эндоглюканазы, обозначенные нами эндоглюканаза I и эндоглюканаза II. Основная, наиболее активная эндоглюканаза II имеет молекулярную массу 30 кДа и степень очистки 36,4 раза.

Выделение и очистка целлюлаз гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105.

Для разделения и очистки целлюлазоактивных фракций белков базидиомицета *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 использовали 15-суточную культуральную жидкость. Исходная культуральная жидкость гриба объемом 83 мл имела 1119,36 единиц общей целлюлазной активности, что составляет 5,55 ед/мг удельной активности по отношению белка (табл. 2.).

Таблица 2.

Этапы выделения и характеристика целлюлолитически активных белков из культуральной жидкости гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105

Этапы очистки	Общая активность, ед/мл	Общий белок, мг/мл	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки, раз	Выход активности, %	Выход по белку, %
Культуральная жидкость	1119,36	201,79	5,55	-	100	100
Сгущение на роторном испарителе	1058,47	164,48	6,44	1,16	94,56	81,5
Осаждение КЖ с этанолом 1:5	989,8	126,75	7,81	1,41	88,42	62,8
Гель-фильтрация на TSK HW-55f	570,2	17,37	32,83	5,92	50,9	8,6
Ионообменная хроматография на DEAE TSK HW-650M	347,6	5,2	66,85	12,05	31,05	2,58

На дальнейших этапах очистки ферментов целлюлазного комплекса удельную активность определяли соответственно по выходу очищенного белка.

Затем культуральную жидкость концентрировали на роторном испарителе до объема 32 мл. Общая целлюлазная активность и концентрация белка в полученном ферментном растворе равнялась 1058,47 единиц и 164,48 мг, что составляет в пересчете на белок 6,44 ед/мг удельной активности. Концентрат культуральной жидкости осаждали этиловым спиртом в соотношении КЖ:этанол 1:5 (об./об.). При этом общая активность осадка составляла 989,8 единиц, содержание общего белка 126,75 мг, удельная активность равнялась 7,81 ед/мг белка. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме – 3 мл ацетатного буфера (0,01 М, рН 4,9) и поэтапно разделяли сначала на гель-фильтрационных, затем ионообменных колонках. Полученные белки на каждом

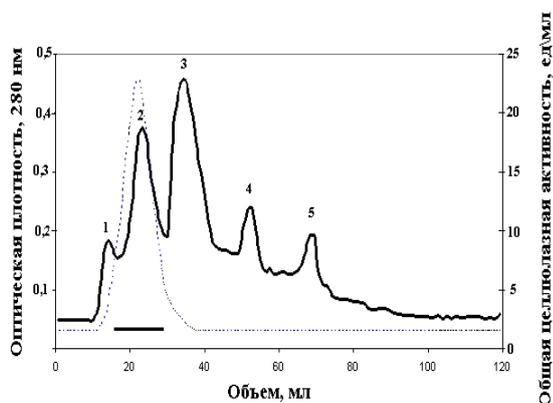
этапе очистки с помощью электрофореза на ПААГе характеризовали по гомогенности.

Гель-фильтрацию осажденного спиртом осадка, растворенного в 3 мл 0,01 М CH_3COONa буфера с рН 4,9, проводили на колонке с TSK HW-55f, уравновешенной вышеуказанным буфером. Элюцию проводили при скорости потока 40 мл/ч, объем фракций составлял 4 мл (рис.6.).

Как видно из рисунка, в концентрате содержалось до пяти белковых фракций, из них только вторая фракция ГФ обладала целлюлазной активностью. Объединенные элюаты этой фракции объемом 26 мл характеризовались содержанием 17,37 мг белка и удельной целлюлазной активностью 32,83 ед/мг. Таким образом, после гель-фильтрации получена целлюлазоактивная фракция со степенью очистки 5,92 раза.

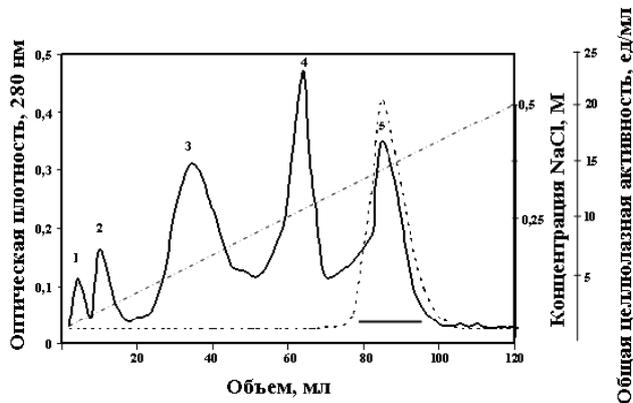
На следующем этапе очистки белковую вторую фракцию ГФ подвергли ионообменной хроматографии на DEAE-TSK HW-650M геле. Профиль элюации белков представлен на рисунке 8, из которого видно, что в линейном градиенте NaCl элюированы 5 белковых фракций. Из них только пятая фракция обладала целлюлазной активностью. Данная фракция характеризуется удельной активностью 66,85 ед/мг и содержанием белка в количестве 5,2 мг (рис.7.).

Целлюлазоактивные фракции белков культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, полученные после гель-фильтрации (вторая фракция ГФ) и после ионообменной хроматографии (фракция 5), исследовали на гомогенность методом электрофореза в денатурирующих условиях в 10%-ном ПААГе с целью оценки эффективности этапов очистки.



Колонка 1,5×65 см, подвижная фаза 0,01М CH_3COONa , рН 4,9; скорость потока 40 мл/ч, объем фракций – 4 мл; сплошная линия – оптическая плотность; пунктирная – активность фермента.

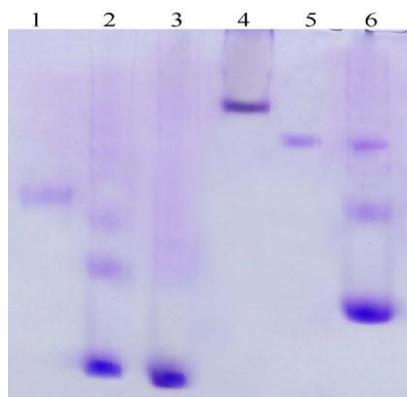
Рис. 6. Гель-фильтрация ферментного препарата гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 на TSK HW-55f



Колонка 1×10 см с DEAE-TSK HW-650M гелем; буфер 0,01 М натрий ацетат, рН 4,9; линейный градиент концентрации NaCl 0-0,5М; скорость потока 60 мл/ч; объем фракций – 2 мл; сплошная линия – оптическая плотность; пунктирная – активность фермента.

Рис. 7. Ионообменная хроматография целлюлазоактивных белков гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105

Электрофоретический анализ показал, что вторая фракция ГФ, полученная после гель-фильтрации, состоит из 3 белковых компонентов (рис. 8.), а фракция 5, полученная из нее после ионообменной хроматографии, оказалась электрофоретически гомогенным белком, который по логарифму продвижения в сравнении с белками-маркерами с известными молекулярными массами имеет молекулярную массу около 48 кДа.



10 % ПААГ, проявитель Кумасси голубой; 1 – пепсин (Mr 34700 Da), 2 – β – лактоглобулин (Mr 18400 Da), 3 – лизоцим (Mr 14300 Da), 4 – бычий сывороточный альбумин (Mr 66000 Da), 5 – фракция – 5 эндоглюканаза после ионообменной хроматографии (Mr 48000 Da), 6 – белковая вторая фракция ГФ.

Рис. 8. Электрофорез целлюлазоактивных фракций *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 в сравнении со стандартными маркерами

На рисунке 8 также видно содержание данного белка в составе целлюлазоактивной 2 – фракции, полученной после гель-фильтрации.

Таким образом, из культуральной жидкости штамма *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 выделена и очищена целлюлазоактивная гомогенная белковая фракция, представляющая собой эндо-1,4- β -глюканазу. Она характеризуется молекулярной массой около 48 кДа и удельной активностью 66,85 ед/мг белка. Степень очистки составляет 12,05 раза, выход по активности – 31,05%, по белку – 2,58%.

Изучение температурного оптимума активности очищенных эндоглюканаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. Проведенные эксперименты по установлению температурного оптимума активности очищенных форм эндоглюканаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 показали, что фермент, выделенный из микромицета в испытываемых температурных диапазонах (20-60°C) показал самую высокую активность при температуре 50°C. Эндоглюканаза базидиомицета оказалась активнее при 40°C (рис. 9). Полученные данные показывают, что очищенный целлюлолитически активный фермент из гриба *Aspergillus terreus* 9 является более термотолерантным, что немаловажно при его использовании в различных производственных и климатических условиях.

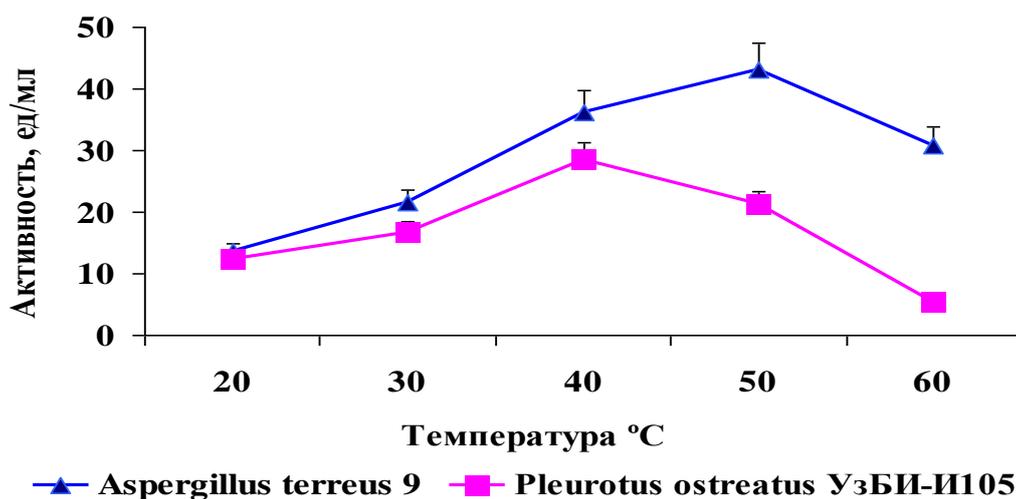


Рис. 9. Температурный оптимум активности очищенных эндогликоканаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105

Очищенная форма эндо-1,4-β-гликоканазу, полученная из *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 оперативно работает при температуре 40°C, т.е. она является термолабильным белком. Данный температурный оптимум также свидетельствует о технологической ценности этого гриба и его целлюлаз, т.к. их использование возможно в различных отраслях промышленности при температуре 38-40°C.

Изучение рН оптимума активности очищенных эндогликоканаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. Изучение рН-оптимума активности очищенных форм ферментов проводили в 0,2 М натрий ацетатном буфере в диапазоне значений рН 3,6-5,8 [Досон Э. и др., 1991]. Полученные данные показали (рис. 10.), что для эндогликоканазы микромицета *Aspergillus terreus* 9 высокая активность фермента начинала проявляться при рН реакционной среды от 4,4 до 5,2 и достигала своего максимума при рН 4,9.

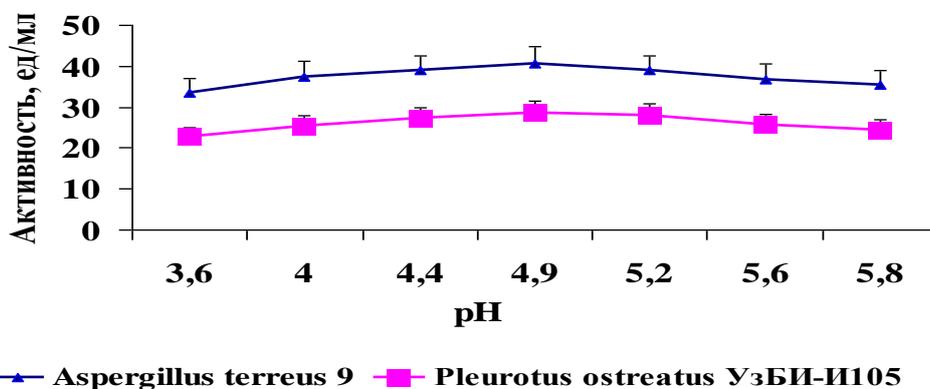


Рис. 10. рН оптимум действия очищенных эндогликоканаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105

В диапазоне рН 3,6-4,4 и 5,2-5,8 наблюдалось незначительное снижение активности фермента. Для очищенной эндоглюканазы из гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 оптимальным значением рН также оказалось значение 4,9. Но, в отличие от эндоглюканазы *Aspergillus terreus* 9 при больших значениях рН эндоглюканаза *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 была менее активной. Полученные экспериментальные данные показали, что очищенные эндоглюканазы из грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 по оптимуму рН действия в реакционной смеси были примерно одинаковы.

В таблице 3 дана сравнительная характеристика некоторых физико-химических свойств эндо-1,4-β-глюканаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, из которой видно, что эндоглюканазы отобранных грибов отличаются по молекулярной массе, оптимальным значениям температуры и другим свойствам.

Так, эндоглюканаза гриба *Aspergillus terreus* 9 отличается от эндоглюканазы *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 меньшей молекулярной массой, более высокими температурными оптимумами действия и удельной активностью.

Таблица 3.

Сравнительные свойства очищенных эндоглюканаз мицелиального и базидиального грибов

№	Показатели	Эндо-1,4-β-глюканаза <i>Aspergillus terreus</i> 9	Эндо-1,4-β-глюканаза <i>Pleurotus ostreatus</i> УзБИ-И105
1.	Молекулярная масса по электрофорезу на 10% ПААГе	30 кДа	48,0 кДа
2.	Удельная активность, ед/мг	73,89	66,85
3.	Температурный оптимум, °С	50	40
4.	Температурный диапазон, °С	35-60	30-45
5.	рН – оптимум	4,9	4,9
6.	рН – диапазон	4,4-5,2	4,0-5,6
7.	K _m по Михаэлису – Ментен, мкм	0,132	0,097

Влияние ферментных препаратов грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 на всхожесть семян хлопчатника.

В целях выявления перспективности практического использования полученных нами грибных целлюлаз в хлопководстве изучено влияние смеси (1:1) очищенных ферментов микромицета и макромицета, (содержащей 140 ед/мг активности) на всхожесть семян и рост проростков хлопчатника в лабораторных условиях путем обработки опущенных семян хлопчатника сорта «Наманган-77».

Предпосевную обработку семян проводили путем замачивания при расходе воды 500 л/т семян [Э.Т. Шайхов и др. 1990, Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения в сельском хозяйстве Республики Узбекистан, 2007]. В наших опытах семена замачивали смесью ферментов, разбавленных с учетом расхода фермента на гидролизуемый субстрат. Расчет проводили таким образом: 5 ед/мг фермента расходуется на гидролиз 1 г/целлюлозы, т.е. для обработки 1 т семян с содержанием целлюлозы 45% расходуется 16 г фермента. С учетом активности ферментов нами была взята норма – 1,6 мг Е/100 г семян, разбавленная до 50 мл дистиллированной водой.

Предпосевная замочка семян продолжалась в течение 2 часов при 22-25°C, затем семена проветривали на воздухе и высевали в чашки Петри и горшки со стерильным песком или почвой.

Всхожесть определяли в течение 3 – 5 суток, тогда как рост проростков в горшках проводили в течение 9 – 12 суток, на предварительно простерилизованном и увлажненном дистиллированной водой песке (60% масс). На 9 сутки проростки извлекали из грунта и измеряли их длину.

Предпосевную обработку семян проводили в четырех вариантах:

- 1) семена хлопчатника, замоченные в смеси очищенных эндоглюканаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105;
- 2) семена хлопчатника, замоченные в очищенной эндоглюканазе гриба *Aspergillus terreus* 9;
- 3) семена хлопчатника, замоченные в очищенной эндоглюканазе гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105;
- 4) контроль – семена хлопчатника, замоченные в дистиллированной воде (рис. 11 и 12).

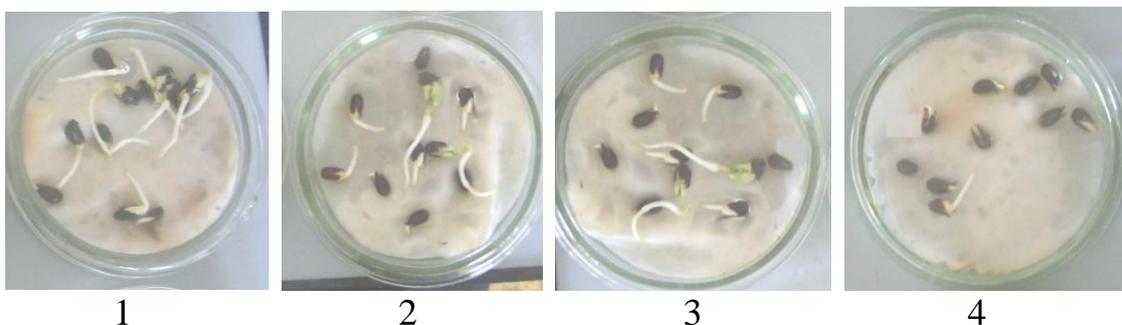


Рис. 11. Влияние целлюлаз *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 на всхожесть семян хлопчатника

Из рисунка видно, что всхожесть семян значительно увеличивалась при предпосевном замачивании грибными препаратами. Всхожесть 3^x – суточных семян обработанных смесью эндоглюканаз – 90%, эндоглюканазой *Aspergillus terreus* 9 – 70%, эндоглюканазой *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 – 80%, контрольных семян 40%.



Рис. 12. Влияние целлюлазных препаратов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 на прорастание семян хлопчатника в течение 9 суток

Результаты, полученные на 9-суточных проростках хлопчатника при выращивании в песке, подтверждают данные, полученные по всхожести семян в чашках Петри.

Испытание эндоглюканаз на всхожесть семян и рост проростков свидетельствуют о возможности их использования в хлопководстве при предпосевной обработке семян хлопчатника, что доказана произведенных испытаниях нативного фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение продуцентов ферментов, биологически активных веществ и ценных продуктов клеточного метаболизма является важнейшей проблемой, имеющей научный и практический интерес. Поэтому, изучение биологических закономерностей изменения физиологического состояния продуцентов ферментов и других биологически активных веществ под влиянием внешних условий является теоретической и практической научной базой современной биотехнологии. Несомненно, понимание механизмов функционирования ферментов как *in vivo*, так и *in vitro* является актуальной проблемой. Её решение включает такие аспекты, как появление множественных молекулярных форм ферментов в процессе роста и развития микроорганизмов, пути и причины возникновения различных изоформ, закономерности их выделения клетками в окружающую среду. Решение этой проблемы в значительной степени облегчит осуществление ряда задач современной биотехнологии, связанных с получением ферментов для использования в научных исследованиях, сельском хозяйстве, пищевой и других отраслях промышленности. Указанные задачи относятся и к целлюлазным ферментам (эндоглюканазы, целлобиогидролазы, экзоглюкозидазы, целлобиазы) микроорганизмов, поскольку они способствуют биоконверсии растительных отходов, а при воздействии на семена хлопчатника увеличивают их всхожесть и уменьшают сроки прорастания проростков. Это направление биотехнологии стало интенсивно развиваться в середине прошлого столетия. Основой

послужили исследования по выделению, характеристике и установлению механизма действия целлюлаз.

В результате скрининга нами отобраны активные продуценты целлюлаз – микромицет *Aspergillus terreus* 9 и базидиомицет *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. В культуральной жидкости этих грибов в динамике роста и развития определена активность целлюлаз, ксиланаз и количественное содержание белка. Подобран оптимальный состав субстрата из отходов мукомольного производства и деревообрабатывающей промышленности. Обнаружено, что наибольшая активность грибов наблюдается при культивировании на среде с древесными опилками (1 %) и пшеничными отрубями (2 %) на 6-12 сутки культивирования для *Aspergillus terreus* 9 и на 9-15 сутки для *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105.

Используя методы обессоливания с помощью геля Сефадекс G-10, гель-хроматографии на сорбенте TSK HW-55 и ионообменной хроматографии на DEAE TSK HW 650 из культуральной жидкости *Aspergillus terreus* 9 получены две фракции целлюлаз (эндоглюканазы): фракция I с удельной активностью 2,60 ед/мг и содержанием белка 27,28 мг и более активная фракция II с удельной активностью 73,89 ед/мг и содержанием 7,68 мг белка. Электрофоретический анализ этих фракций на 10 % ПААГе показал, что фракция I состоит из 4 белковых компонентов. Фракция II содержит электрофоретически гомогенный белок с молекулярной массой 30 кДа. Из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии выделена одна фракция целлюлазы с удельной активностью 66,85 ед/мг и содержанием белка 5,2 мг. Электрофоретический анализ на 10 % ПААГе показал, что данная фракция электрофоретически гомогенная и имеет молекулярную массу около 48 кДа.

Испытание очищенных ферментов обоих штаммов грибов на семенах хлопчатника, по сравнению с контролем, показали более высокую всхожесть семян, что приводило к сокращению времени появления всходов, росту и развитию проростков.

Таким образом, нами выявлено, что микромицет *Aspergillus terreus* 9 и базидиомицет *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 являются активными продуцентами целлюлаз, ксиланаз и других ферментов в глубинной культуре. Термостабильность выделенных целлюлаз, является ценным свойством для применения полученных ферментов в различных отраслях промышленности.

Выводы:

1. В результате скрининга среди местных штаммов микромицетов отобран мицелиальный гриб *Aspergillus terreus* 9, а среди базидиомицетов *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 как активные продуценты целлюлаз. Установлено, что максимальное ферментообразование (12 и 15 сутки роста) достигается при их культивировании на питательной среде Чапека-Докса, в которой в качестве единственного источников углерода использованы: микрокристаллические целлюлоза (3%), ксилан (3%), древесные опилки (1,0%) и пшеничные отруби (2,0%).

2. Из 12 суточной культуральной жидкости штамма *Aspergillus terreus* 9 выделена и очищена эндо-1,4-β-глюканаза I, состоящая из четырех белковых компонентов, с удельной активностью 2,60 ед/мг и более активная эндо-1,4-β-глюканаза II, имеющая молекулярную массу 28-30 кДа и удельную активность 73,89 ед/мг. Из 15 суточной культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 выделена эндо-1,4-β-глюканаза, с молекулярной массой 48 кДа и удельной активностью 66,85 ед/мг.

3. Сравнительное изучение очищенных целлюлаз грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 показало, что эндоглюканы отличаются между собой по молекулярным массам, удельной активности, выходу ферментного белка и температурному оптимуму. Ферменты сходны по широкому диапазону pH. Температурный оптимум действия очищенной эндоглюканазы II микромицета – 50°C, оптимальное значение pH – 4,9. Температурный оптимум действия очищенной эндоглюканазы базидиомицета *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 – 40°C, оптимальное значение также pH – 4,9.

4. Разработаны лабораторные регламенты получения двух высокоактивных очищенных эндоглюканаз из грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 при их культивирований на дешевых растительных отходах в подобранных концентрациях и условиях. Разработаны схемы получения очищенных форм целлюлаз из отобранных грибов.

5. Предпосевная обработка семян хлопчатника «Наманган-77» смесью очищенных ферментов (1:1) показала синергизм действия различающихся форм ферментов, что приводило к интенсификации процесса прорастания и увеличению длины проростков семян.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Ахмедова З.Р., Саттаров М.Э., Ахмедов О.У., Гулямова З.Т. Ферменты грибов гидролизующие целлюлозу древесины // Проблемы современной микробиологии и биотехнологии Сб. тезисов посвященной памяти С.А. Аскарковой. – Ташкент, 2003. – С. 11.

2. Саттаров М.Э., Ахмедова З.Р., Гулямова З.Т., Кузьмина Л.А., Ахмедов О.У. Изучение ферментных систем дереворазрушающих грибов ксилотрофов // «Биотехнология: состояние и перспективы развития» // III Московский Международный Конгресс: Тез. докл. – Москва, 2005. – С. 64-65.

3. Саттаров М.Э. Ўсимлик уруғларига ишлов беришинг самарадорлиги // III съезд микробиологов Узбекистана: Тез. докл. – Ташкент, 2005.– С. 127.

4. Кузьмина Л.А., Саттаров М.Э., Муродуллаев А. Применение энзимов в сельском хозяйстве // III съезд микробиологов Узбекистана: Тез. докл. – Ташкент, 2005.– С. 64.

5. Саттаров М.Э., Ахмедов О.У., Гулямова З.Т. Қишлоқ хўжалиги экинлари чиқиндилари биоконверсияси // III съезд микробиологов Узбекистана: Тез. докл. – Ташкент, 2005.– С. 128.

6. Ахмедова З.Р., Саттаров М.Э., Муродуллаев А., Касимова С., Аширкулова М.У., Гулямова З.Т. Использование энзимов и их композиций в возделывании некоторых сельскохозяйственных культур // «Биотехнология: состояние и перспективы развития» / IV Московский международный конгресс: Тез. докл. – Москва, 2007. – С. 85.

7. Sattarov M.E., Akhmedova Z.R., Murodullaev A., Salomov Sh.Sh., Djanikulova U.B., Mirzarahmetova D.T., Gulyamova I.T., Kasimova S.. Uses of microbial enzymatic compositions in cultivation of some agricultures // 7th Internat. Symp. on the Chemistry of Natural Compounds 50 years anniversary S. Yunusov. – Tashkent, Uzbekistan, 2007. – P.268.

8. Саттаров М.Э. Маҳаллий *Aspergillus terreus*–9 замбуруғининг целлюлолитик фаоллиги // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2008. – №4. – С. 23-25.

9. Саттаров М.Э., Ахмедова З.Р. Сравнительное изучение ферментов некоторых базидиальных и мицелиальных грибов и аспекты их использования // ДАН РУз. – Ташкент, 2008. – №4. – С. 76-79.

10 Ахмедова З.Р., Муродиллаев А., Саттаров М.Э., Саломов Ш.Ш., Джаникулова У.Б., Мирзарахметова Д.Т., Гулямова И.Т. Технология использования микробных ферментных препаратов и их композиций в возделывании сельскохозяйственных культур // Микробное Разнообразие состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал / III Международная Конференция: Тез. докл. – Н. Новгород–Пермь, 2008. – С. 17-18.

11 Саттаров М.Э., Ахмедова З.Р., Муродиллаев А., Саломов Ш.Ш., Джаникулова У.Б., Яхяева М.А., Ярашева М.Т.. Целлюлолитик ферментлардан қишлоқ хўжалигида фойдаланиш истиқболлари // IV съезд микробиологов Узбекистана: Тез. докл. – Ташкент, 2008.– С. 116-117.

12 Ахмедова З.Р., Саттаров М.Э., Саломов Ш.Ш., Джаникулова У.Б., Муродиллаев А., Мирзарахметова Д.Т., Яхяева М.А., Гулямова И.Т. Грибы ксилотрофы и ферментные препараты – источники создания перспективных биотехнологий в сельском хозяйстве // «Биотехнология: состояние и перспективы развития» / V Московский международный конгресс: Тез. докл. – Москва, 2009. – С. 387-388.

13 Саттаров М.Э., Ахмедова З.Р., Муродиллаев А., Саломов Ш.Ш., Джаникулова У.Б., Кузьмина Л.А. Ксилотроф замбуруғлардан қишлоқ хўжалигида фойдаланиш истиқболлари // ДАН РУз. – Ташкент, 2009. – №4. – С. 69-71.

14 Саттаров М.Э., Ахмедова З.Р. *Aspergillus terreus* 9 ва *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 замбуруғлари целлюлолитик хоссаларининг қиёсий тавсифи // Проблемы современной микробиологии и биотехнологии: Тез. докл. науч. конф. Посвященной памяти известного научного и общественного деятеля академика Халмурадова Аскара Ганиевича. 23 октября 2009. – Ташкент, 2009. – С. 48-49.

**Биология фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Саттаров
Музаффар Эштемировичнинг 03.00.23 – биотехнология ихтисослиги
бўйича “*Aspergillus terreus* 9 ва *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105
целлюлазаларини ажратиш ва тавсифлаш” мавзусидаги
диссертациясининг
РЕЗЮМЕСИ**

Таянч сўзлар: фермент, целлюлаза, эндоглюканаза, базидиомицет, микромицет, целлюлолитик фаоллик, ксиланаза фаоллиги, *Aspergillus terreus*, *Pleurotus ostreatus*.

Тадқиқот объектлари: микромицетлар – *Aspergillus terreus* 9, *Aspergillus terreus* Н, *Aspergillus niger* 20 ва *Aspergillus niger* 4; базидиомицетлар – *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, *Inonotus hispidus* УзБИ-Т8, *Fomes fomentarius* УзБИ-Я55 ва *Panus tigrinus* УзБИ-ГО13.

Ишнинг мақсади: микромицет ва базидиомицет замбуруғлар орасидан целлюлазанинг юқори фаолликка эга продуцентларини аниқлаш, улардан целлюлаза препаратини олиш ва қиёсий тавсифлаш, шунингдек целлюлазаларнинг комплекс препаратларини уруғга экишдан олдин ишлов бериш учун қўллаш усулларини ишлаб чиқиш.

Тадқиқот методлари: диссертация ишида микробиологик ва биотехнологик усулларидадан фойдаланилган.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: биринчи марта сапротроф ва ксилотроф замбуруғлар ва танлаб олинган *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 – юқори фаолликка эга маҳаллий штаммларнинг целлюлолитик фаолликларининг қиёсий таҳлили ўтказилди.

Целлюлазанинг асосий намояндаси бўлган хужайрадан ташқарига секрецияланувчи, юқори фаолликка эга, бирқатор хусусиятлари, яъни ўзаро фаоллиги, молекуляр массаси ва каталитик хоссаларига кўра фарқланувчи эндо-1,4-β-глюканаза формалари ажратилди ва тозаланди. Илк бор *Aspergillus terreus* 9 ва *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 замбуруғлари тоза эндоглюканазаларининг пахта чигити унувчанлигига бўлган синергетик таъсири исботланди.

Амалий аҳамияти: сапротроф ва ксилотроф замбуруғлар ўртасида ўтказилган скрининг натижалари кўра юқори фаолликка эга иккита штамм – микромицет *Aspergillus terreus* 9 ва базидиомицет *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 танлаб олинди. Физик-кимёвий, каталитик хоссаларига кўра фарқланувчи эндоглюканазаларнинг иккита формаси ажратилди ва тозаланди. Иккала замбуруғ ферментларининг тоза формаларини чигитни экиш жараёнида биргаликда қўллаш унинг унувчанлигини ва униб чиқиш қувватини оширади ва бу целлюлазаларнинг комплекс препаратларини пахтачиликда қўллаш имкониятларини яратади.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: *Aspergillus terreus* 9 ва *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 замбуруғлари культурал суюқликларидан тоза эндоглюканаза ферментларини олишнинг лаборатория регламенти ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларини, ўсимлик чиқиндилари биоконверсияси ва утилизациясида, шунингдек чигитга экишдан олдин ишлов беришда ва қишлоқ хўжалигининг бошқа соҳаларида қўллаш мумкин.

Қўлланиш соҳаси: биотехнология, қишлоқ хўжалиги, тўқимачилик, озик овқат ва ёғочни қайта ишлаш саноати.

РЕЗЮМЕ

диссертации Саттарова Музаффа Эштемировича на тему:
«Выделение и характеристика целлюлаз *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.23-биотехнология

Ключевые слова: фермент, целлюлаза, эндоглюканаза, базидиомицет, микромицет, целлюлолитическая активность, ксиланазная активность, *Aspergillus terreus*, *Pleurotus ostreatus*.

Объекты исследования: микромицеты – *Aspergillus terreus* 9, *Aspergillus terreus* Н, *Aspergillus niger* 20 и *Aspergillus niger* 4; базидиомицеты – *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105, *Inonotus hispidus* УзБИ-Т8, *Fomes fomentarius* УзБИ-Я55 и *Panus tigrinus* УзБИ-ГО13.

Цель работы: выявление высокоактивных продуцентов целлюлаз из микромицетов и базидиомицетов, получение очищенных препаратов целлюлаз и их сравнительная характеристика, разработка способа применения комплексного препарата целлюлаз для предпосевной обработки семян.

Методы исследования: микробиологические и биохимические.

Полученные результаты и их новизна: впервые проведен сравнительный анализ целлюлолитической активности сапротрофных и ксилотрофных грибов и отобраны высокопродуктивные местные штаммы – *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. Выделены и очищены секретлируемые высокоактивные формы эндо-1,4-β-глюканаз, различающиеся по активности, выходу, молекулярной массе и каталитическим свойствам. Впервые доказано синергетическое влияние очищенных эндоглюканаз *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105 на прорастание семян хлопчатника.

Практическая значимость: в результате скрининга среди сапротрофных и ксилотрофных грибов отобраны два высокоактивных штамма *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. Выделены и очищены две формы эндоглюканаз, отличающиеся физико-химическими и каталитическими свойствами. При совместном использовании очищенных форм ферментов обоих грибов в предпосевной обработке семян хлопчатника повышается всхожесть и энергия прорастания, что открывает возможность для использования комплексных препаратов целлюлаз в хлопководстве.

Степень внедрения и экономическая эффективность: разработаны лабораторные регламенты получения очищенных эндоглюканаз из культур грибов *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* УзБИ-И105. Результаты исследований могут быть использованы при биоконверсии и утилизации

растительных отходов, а также предпосевной обработке семян хлопчатника и других сельскохозяйственных культур.

Область применения: биотехнология, сельское хозяйство, текстильная, пищевая и деревоперерабатывающая промышленности.

RESUME

Thesis of Sattarov Muzaffar Eshtemirovich on the scientific degree competition of the doctor of philosophy in biology on speciality 00.03.23 – biotechnology, subject: “Isolation and characterization cellulases of *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* UzBI-I105”

Key words: enzyme, cellulase, endoglucanase, basidiomycete, micromycete, cellulolytic activity, xylanase activity of *Aspergillus terreus*, *Pleurotus ostreatus*.

Subject of the inquiry: micromycete – *Aspergillus terreus* 9, *Aspergillus terreus* H, *Aspergillus niger* 20 and *Aspergillus niger* 4; basidiomycete – *Pleurotus ostreatus* UzBI-I105, *Inonotus hispidus* UzBI-T8, *Fomes fomentarius* UzBI -Y55 и *Panus tigrinus* UzBI -GO13.

Aim of the inquiry: finding out the high active cellulase zymogens from micromycete and basidiomycete, obtaining purified cellulase preparations and studying their comparative characteristics, development the way of composite cellulases application in seeds’ presowing treatment.

Methods of inquiry: microbiological and biotechnological

The results achieved and their novelty: contrastive analysis of cellulolytic activity of saprophytic and xilanophytic fungi were carried out and highly productive local cultures were selected– *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* UzBI-I105. High active secreted forms of endo-1,4- β -glucanases were isolated and purified. They differ in activity, yield, molecular weight and catalytic properties. It is proved the synergetic influence of purified endoglucanases of *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* UzBI-I105105 on germination of cotton-plant seeds.

Practical value: application of purified enzymes of *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* UzBI-I105 in presowing treatment of cotton-plant seeds is resulted in reducing of sprouting up period and increasing of germinating capacity that open up possibilities for application the composite cellulases in cotton-growing.

Degree of embed and economic effectivity: it is developed the laboratory regulations for production of purified endoglucanases from *Aspergillus terreus* 9 и *Pleurotus ostreatus* UzBI-I105. Gained results are useful in presowing treatment of seeds of cotton-plant and crops as well as in bioconversion and recycling of plant waste products.

Sphere of usage: biotechnology, agriculture, textile industry, food industry and woodworking industry.

Соискатель _____

Разрешено в печать 10.05.2010. Размер бумаги 60x84 $\frac{1}{16}$. Тираж 100 шт. Заказ № 18.

Отпечатано в типографии ФБАН РУз. И. Муминов 13.