

УДК 577.083.185

## ВЫДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГРИБА *TRICHODERMA HARZIANUM B1*

Умаров Б.Р.<sup>1</sup>, Сагдиев Н.Ж.<sup>2</sup>, Ким А.Л.<sup>2</sup>, Инагамов У.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии АН РУз

ул. А. Кадыри, 7б, Ташкент, 100128, Узбекистан

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. А.С. Садыкова АН РУз.

ул. Мирзо Улугбека, 83, Ташкент, 100125, Узбекистан

b.r.umarov@mail.ru

### АБСТРАКТ

В условиях глубинного культивирования на среде с 2%-ными пшеничными отрубями, как единственным источником углерода, на качалке при 200 об/мин., при температуре 30±1°C в течение 5 суток местный штамм *Trichoderma harzianum B1* продуцировал целлюлолитические ферменты. В культуральной жидкости изучены внеклеточные белки и ферменты целлюлазного комплекса. Выделены и очищены целлюлолитические ферменты с помощью хроматографии разных систем и разными гель-носителями на сефадексе G-75, Акрилекс П-60 и на ионообменной хроматографии ДЭАЭ Тойперл 650М геле. Молекулярная масса выделенных белков и ферментов определена с помощью электрофореза на 12% ПААГ в присутствии 0,1% SDS с использованием маркерных белков с известными молекулярными массами. Молекулярная масса трёх изоформ эндо-1,4-β-глюканазы (ЕС 3.2.1.4), EG 1, EG 2 и EG 3 соответствовала ММ 35±1 кДа, с целлюлолитической активностью 90,4, 77,52 и 78,92 ед/мг белка, а молекулярная масса четырёх изоформ целлобиазы (1,3-β-глюкозидазы, ЕС 3.2.1.21), СВН 1, СВН 2, СВН 3 и СВН 4 соответствовала ММ 24±1 кДа, с целлюлолитической активностью 2,60, 3,80, 4,3 и 3,0 ед/мг белка. Изучено влияние температуры, pH среды и ионов металлов на целлюлолитическую активность и стабильность изучаемых ферментов. Оптимальные температуры эндо-1,4-β-глюканазы и целлобиазы (1,3-β-глюкозидазы) были равны 50°C и pH в пределах 4,8. Эффект одно- и двухвалентных ионов металлов К, Na, Fe, Mg и Mn в буферной среде увеличили активность ферментов 1,4-β глюканазы на 10%, и 1,3-β глюкозидазы на 15%.

Ключевые слова: *Trichoderma harzianum B1*, изоформы эндо-1,4-β-глюканазы, 1,3-β-глюкозидазы.

## ISOLATION OF CELLULOLYTIC ENZYMES FROM THE FUNGUS *TRICHODERMA HARZIANUM B1*

Umarov B.R.<sup>1</sup>, Sagdiev N.G.<sup>2</sup>, Kim A.V.<sup>2</sup>, Inagamov U.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Uzbekistan

7b, A. Kadyri str., Tashkent, 100128, Uzbekistan

<sup>2</sup>A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

83, M. Ulugbek str., Tashkent, 100125, Uzbekistan

b.r.umarov@mail.ru

### ABSTRACT

The local strain of *Trichoderma harzianum B1* produces cellulolytic enzymes when cultured submerged in a medium containing 2% wheat bran as the sole carbon source. Chromatography systems using different carriers and different matrices, including Sephadex G-75, P-60 Akroleks, and ion exchange chromatography on DEAE 650M gel Toyperl, were used to isolate three isoforms of endo-1,4-β-glucanase (EC 3.2.1.4), EG 1, EG 2, and EG 3 and determined a molecular weight (MW) of 35±1 kDa. The isolates exhibited a cellulolytic activity of 90.4, 77.52, and 78.92 U/mg protein. In addition, we isolated four isoforms of cellobiase (1,3-β-glucosidase, EC 3.2.1.21) СВН 1, СВН 2, СВН 3, and СВН 4 with aMW 24±1 kDa, and a cellulolytic activity of 2.60, 3.80, 4.3, and 3.0 U/mg protein. The influence of the temperature, pH, and metal ions on the activity was determined for the cellulolytic enzymes. The optimal pH and temperature of endo-1,4-β-glucanase and cellobiase (1,3-β-glucosidase) was observed to be pH 4.8 and 50°C. The effect of the monovalent and divalent

**metal ions K, Na, Fe, Mg, and Mn in a buffered medium increased the enzymatic activity of 1,4- $\beta$ -glucanase by 10%, and of 1,3- $\beta$ -glucosidase by 15%.**

**Keywords:** *Trichoderma harzianum* B1, cellulolytic enzymes, endo-1,4- $\beta$ -glucanase, 1,3- $\beta$ -glucosidase

## ВВЕДЕНИЕ

Целлюлазы (целлюлолитические ферменты) – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз 1,4-гликозидных связей в молекуле целлюлозы с образованием набора олигосахаридов различной степени полимеризации вплоть до мономера – глюкозы. Различают два основных типа целлюлазы: 1) эндоглюканазы (1,4-глюкан-4-глюканогидролазы, эндо-1,4-глюканазы); 2) целлюбиогидролазы (1,4-D-глюкан-4-целлюбиогидролазы, экзоцеллюбиогидролазы) [1]. Эти два типа целлюлазы отличаются по характеру действия на молекулы целлюлозы и, как правило, действуют совместно. Целлюлазы первого типа гидролизуют связи в молекуле целлюлозы и некоторых ее растворимых производных (карбоксиметил-, гидроксиэтилцеллюлоза и др.). Целлюлазы второго типа гидролизуют молекулы целлюлозы, образуя почти исключительно целлюбиозу, которую они отщепляют с невозстанавливающегося конца полисахарида (n – число звеньев цепи). Характерное свойство двух типов целлюлазы – наличие синергизма (взаимного усиления) при их совместном действии на высокоупорядоченные формы целлюлозы (хлопковое волокно, микрокристаллическая целлюлоза) [2]. Ферментные системы грибов содержат, как правило, множественные формы обеих форм целлюлазы, отличающиеся молекулярной массой, изоэлектрической точкой и содержанием ковалентно связанных углеводных остатков [3]. Часть целлюлазы – истинные изоферменты, кодируемые самостоятельными генами, другие формы образуются при посттрансляционной модификации основных типов целлюлазы. Ферментативная деструкция целлюлозы происходит, как правило, под действием не отдельных ферментов, а полиферментных систем (комплексов) [4]. Ферментам этих систем присущи определенная специализация: одни из них эффективно гидролизуют «внутренние», а другие предпочтительно расщепляют «внешние» гликозидные связи, находящиеся на концах полисахаридной молекулы (экзодеполимеразы, экзоглюканазы, экзоферменты). Глюкозидазы осуществляют гидролиз гликозидных связей ди- и олигосахаридов [5].

Целью настоящей работы являлось выделение и изучение целлюлолитических ферментов эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы (ЕС 3.2.1.4) и целлюбиазы (1,3- $\beta$ -глюкозидазы) (КФ 3.2.1.21) у местных штаммов грибов *T. harzianum* B1, выращенных в условиях глубинного культивирования.

## МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Штамм и условия культивирования.** Объектом исследования служил штамм гриба *T. harzianum* B1, продуцент целлюлолитических ферментов, полученный из коллекции Института микробиологии АН РУ. Выращивание штамма *T. harzianum* B1 проводили в глубинных условиях на среде Менделя [6]. В качестве источника углерода использовали 2%-ные пшеничные отруби. Ферментацию проводили на качалке при 200 об/мин., температуре  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 5 суток.

**Определение белка.** Для изучения внеклеточных белков и ферментов целлюлазного комплекса использовали культуральную жидкость (КЖ), насыщенную до 80% солями сульфата аммония. Концентрацию общего белка определяли по методу Мериона Бредфорда [7].

**Выделение и очистка целлюлолитических ферментов.** Хроматографическое выделение индивидуальных компонентов целлюлазного комплекса штамма *T. harzianum* B1 проводили с помощью системы хроматографии на приборе «Uvicord» (LKB Швеция), состоящем из автоматического контроллера процесса, насоса, ультрафиолетового проточного детектора и коллектора фракций.

Гель-фильтрацию высокомолекулярного белка проводили на колонке (2,5x90 см) с сефадексом G-75, уравновешенной 0,05 М натрий-ацетатным буфером, pH 4,75 и Акрилексом П-60, уравновешенной 0,05 М натрий-бикарбонатным буфером.

Ионообменную хроматографию проводили на ДЭАЭ Тойперл 650 М геле «Toya Soda» (Япония) на колонке (1,5x15 см), уравновешенной 0,01 М аммоний гидрофосфатным буфером и элюировали связавшийся белок в градиенте с натрием хлором от 0 до 1,5 М в течение 10 часов.

**Определение активности ферментов.** Эндоглюканазная активность была определена действием фермента на КМЦ: 0,5 мл 1%-ного раствора Na КМЦ в 0,05 М натрий цитратном буфере (pH 5,5) и 0,5 мл ферментного раствора в культуральной жидкости по методу Сомоджи-Нельсона [8].

$\beta$ -глюкозидазную активность определяли путем измерения увеличения содержания редуцирующих сахаров, образовавшихся под действием ферментов на целлюбиозу.

**Определение молекулярной массы.** Молекулярную массу разделенных ферментов (кДа) определяли с помощью электрофореза. Электрофорез белка проводили по прописи Лэмбли [9] на 12% ПААГ в

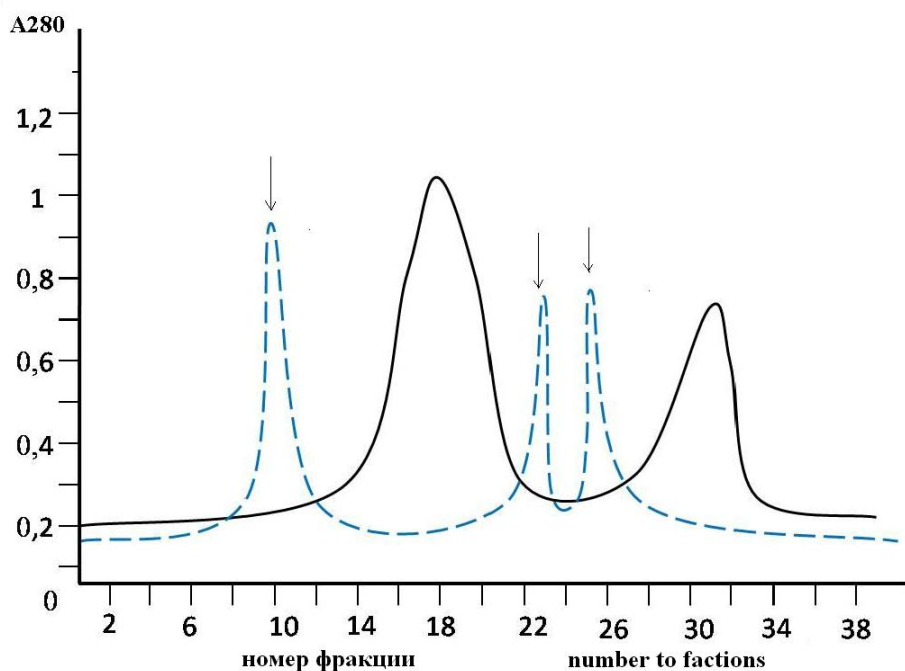
присутствии 0,1% SDS с использованием маркерных белков с известными молекулярными массами в буфере «MES» (Sigma Aldrich). В качестве стандартов использовали маркерный белок «BLUeye Prestained Ladder» 8-240 кДа фирмы «Gene Direx».

**Влияние температуры и pH.** Активность 1,4-β-глюканазы и 1,3-β-глюкозидазы исследовали в пределах температуры 30...80°C и pH среды 3-10, используя стеклянную пробирку со шлифованной пробкой, в 50 мМ ацетатного буфера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы было изучено определение целлюлолитической активности ферментативного комплекса из КЖ штамма *T. harzianum* B1. Ферментативная активность на 5 сутки ферментации в 1000 мл среде достигла максимума 5,3 ед/мг субстрата. Для концентрирования объема белкового раствора из 1000 мл супернатанта КЖ использовали лиофилизованную сушку. Высушенный препарат КЖ был растворен в 100 мл дистиллированной воды. Для осаждения белков использовали аммоний сульфат до 80% насыщения. Осажденные белки растворяли в 15 мл 0,01 М ацетатного буфера, pH 4,75.

**Выделение фермента эндо-1,4-β-глюканазы** (ЕС 3.2.1.4). Фермент был получен с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке размером 2,5x90 см, заполненной сефадексом G-75 и уравновешенной 0,01 М натрий ацетатным буфером, pH 4,75, на приборе «Uvicord» (LKB Швеция) при комнатной температуре в течение 10 часов, скорость потока 60 мл/ч (рис. 1).



Объем фракции 5 мл. Стрелками указаны КМЦ активные фракции

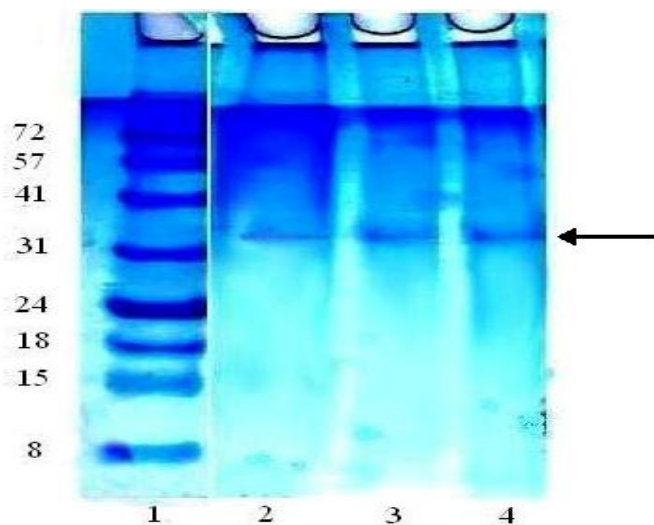
**Рис. 1.** Гель-фильтрация и обессоливание внехромосомных белков КЖ *T. harzianum* B1

Fractions of 5 mL volume. The arrows indicate the CMC active fractions

**Fig. 1.** Gel filtration and desalting of proteins extrachromosomal Cultural liquid of *T. harzianum* B1

Как видно из рисунка 1, при разделении концентрата обнаружены две белковые фракции. Эндо-1,4-β-глюканазная активность проявлялась на подъёме 90,4 ед/мг белка и спуске первого пика двумя активностями 77,52 и 78,92 ед/мг белка. Разделенные три ферментные фракции в объемах 5 мл по ферментативной активности были соответственно в 14 раз выше в полученном, чем в исходном объеме (1000 мл). Фракции №10, №23 и №25, обладающие КМЦ (эндо-1,4-β-глюканазными) активностями, были отмечены как изоформы этих ферментов EG 1, EG 2, и EG 3. Далее объемы этих фракций с активностью эндо-1,4-β-глюканазы были сконцентрированы с помощью лиофилизации до 200 мкл объема и

использованы в дальнейших исследованиях. При электрофорезе разделенные ферментные препараты имели ММ приблизительно одинакового размера  $35 \pm 1$  кДа (рис. 2).



1 – маркер; 2, 3, 4 – фермент эндо-1,4-β-глюканаза 1, 2, 3

**Рис. 2.** Электрофореграмма КМЦ активных фракций

1 – marker; 2, 3, 4 – enzyme endo-1,4 β-glucanase 1, 2, 3

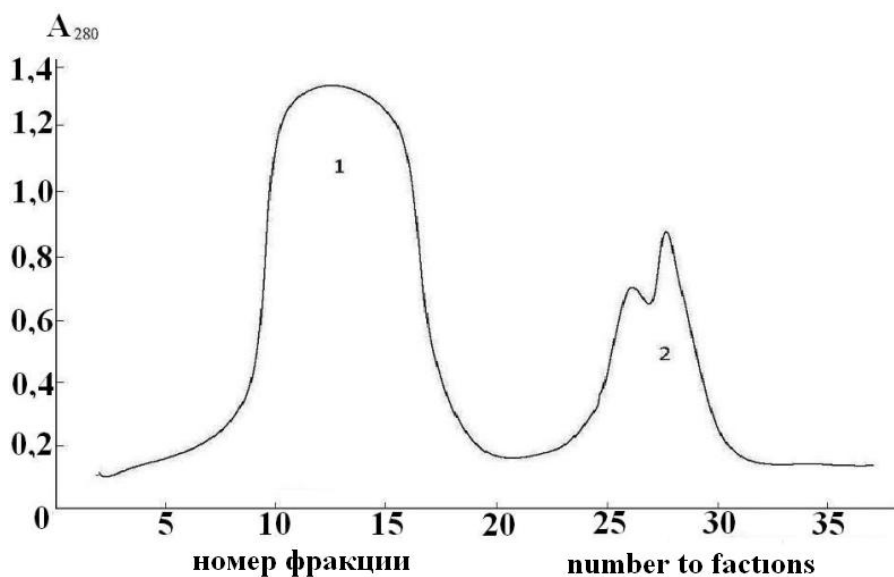
**Fig. 2.** Electrophoregram of CMC active fractions

Полученные после гель-фильтрации три изоформы целлюлазного фермента обладали эндо-1,4-β-глюканазной активностью с одинаковыми молекулярными массами  $35 \pm 1$  кДа. По литературным данным, молекулярная масса грибных эндоглюканаз находится в диапазоне 11-100 кДа, наиболее распространенные эндоглюканазы имеют молекулярную массу 30-55 кДа [10]. Бактериальные эндоглюканазы, как правило, несколько больше грибных и их молекулярные массы выше 65 кДа [11, 12]. Эндоглюканазы, как и другие компоненты целлюлазных комплексов, имеют множественные формы, отличающиеся по молекулярной массе, составу углеводной части, значению изоэлектрической точки, а также молекулярной активности и термостабильности [13]. В одном из наиболее изученных целлюлазных комплексов, продуцируемого микромицетом *Trichoderma viride*, обнаружено пять эндоглюканаз и две целлобиогидролазы. Около 30 множественных форм обнаружено у штамма *Trichoderma reesei* [14]. Множественные формы отмечены у целлюлаз других микроорганизмов, а также у целлюлаз из высших растений [15, 16]. Биологическая роль и причины наличия множественных форм целлюлолитических ферментов до конца не выяснены. Из литературных данных известно, что эндоглюканазам принадлежит важнейшая роль в действии полиферментных систем, поскольку они первыми атакуют целлюлозу. Гидролиз гликозидных связей эндоглюканазами протекает с сохранением конфигурации расщепляемой связи и может сопровождаться трансгликозилированием [17]. Действие эндоглюканаз характеризуется резким уменьшением степени полимеризации (СП) полисахаридных субстратов (уменьшение вязкости растворимых производных целлюлозы), в результате чего могут образоваться низкомолекулярные продукты моно-, ди- и трисахариды [18].

Второй этап нашей работы состоял в выделении фермента целобиазы (1,3-β-глюкозидазы) из 800 мл КЖ *T. harzianum* B1.

**Выделение 1,3-β-глюкозидазы.** 5-суточную КЖ фильтровали через стеклянный фильтр и центрифугировали при 3000 g в течение 30 мин (К-23, Германия), осадок отбросили, супернатант повторно центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин (К-24, Германия). Очищенный прозрачный супернатант в объеме 600 мл был концентрирован с помощью лиофилизованной сушилки, растворен в объеме 60 мл и использован для дальнейших работ. Хроматографию проводили на колонке размером 2,5x90 см, заполненной Акрилексом П-4, уравновешенной 0,01 М натрий ацетатным буфером pH 4,75 на приборе «Uvicord» (ЛКВ, Швеция) при комнатной температуре в течение 10 часов, скорость потока 60 мл/ч. Высокомолекулярная фракция белков (рис. 3, пик 1) обладала 1,3-β-глюкозидазной активностью.

Количество белка определяли по методу Мэрион Бредфорда [7]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (рис. 3).



Элюция с аммиачным буфером pH 6,0, скорость элюции 60 мл/ч, объем фракции 5 мл;  
1 – пик, высокомолекулярная белковая фракция с целлюлолитической активностью

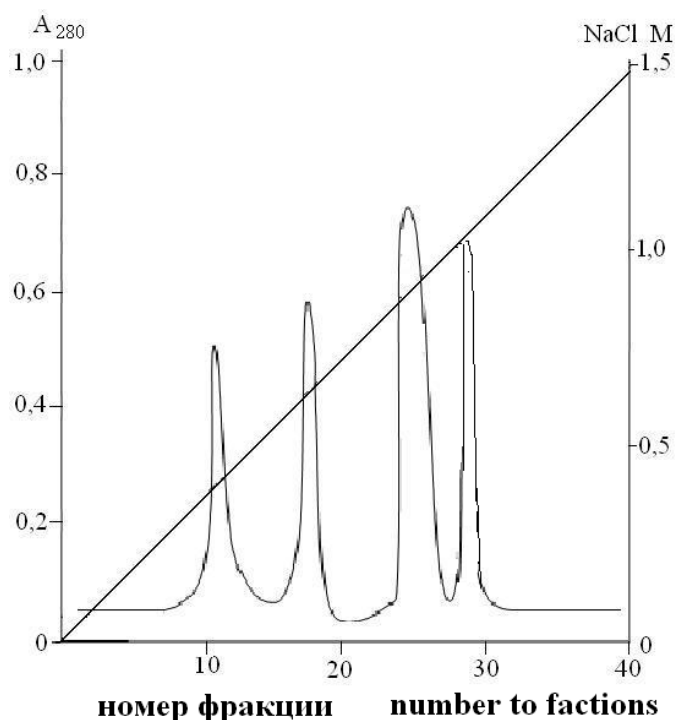
**Рис. 3.** Гель-фильтрация и обессоливание внехромосомных белков КЖ *T. harzianum* B.1

Elution with ammonia buffer pH 6,0, the elution rate of 60 ml/h, fractions of 5 ml volume;  
1 – Peak, high molecular weight protein fraction with cellulolytic activity

**Fig. 3.** Gel filtration and desalination extrachromosomal proteins cultural liquid *T. harzianum* B.1

Объединенная высокомолекулярная белковая фракция с 1,3-β-глюкозидазной активностью в объеме 60 мл была использована для рехроматографического разделения на геле-носителе Акрилекс П-60. Рехроматографию объединенной фракции проводили на колонке (2,5x90 см) с Акрилексом П-60 «Reanal» (Венгрия), уравновешенной аммиачным буфером pH 6,0 при скорости элюции 60 мл/час, объем фракции 5 мл, при 280 нм поглощения. Объединенные фракции в объеме 125 мл имели 1,3-β-глюкозидазную активность 8,4 ед/мг белка. Объединенные фракции были сконцентрированы с помощью лиофилизации. Белковый препарат был растворен в 5 мл буферном растворе и таким образом был в 12 раз сконцентрирован по сравнению с объемом обессоленных белковых фракций.

**Ионообменную хроматографию** ферментного раствора объединенной фракции (рис. 4) проводили на ДЭАЭ Тойперл 650М геле, как описано ранее. Нанесение раствора обессоленного фермента на колонку и связывание белков с носителем контролировали на приборе «Uvicord» (LKB, Швеция). Скорость элюции составляла 60 мл/ч, объем фракции 5 мл, время элюции 7 часов. После нанесения обессоленного раствора фермента на колонку связавшиеся белки отмывали стартовым буфером. Элюирование связавшихся белков из носителя проводили в линейном градиенте NaCl 0-1М, в течение 4 часов. На этом этапе удалось получить две белковые фракции. При дальнейшем увеличении концентрации буфера до 1,5М в течение 3 часов удалось получить ещё 2 белковые фракции. Профиль элюции белков с колонки представлен на рисунке, из которого видно, что связавшиеся белки вымывались только в линейном градиенте NaCl (рис. 4).



Пики 1, 2, 3, 4, обладающие 1,3-β-глюкозидазной активностью

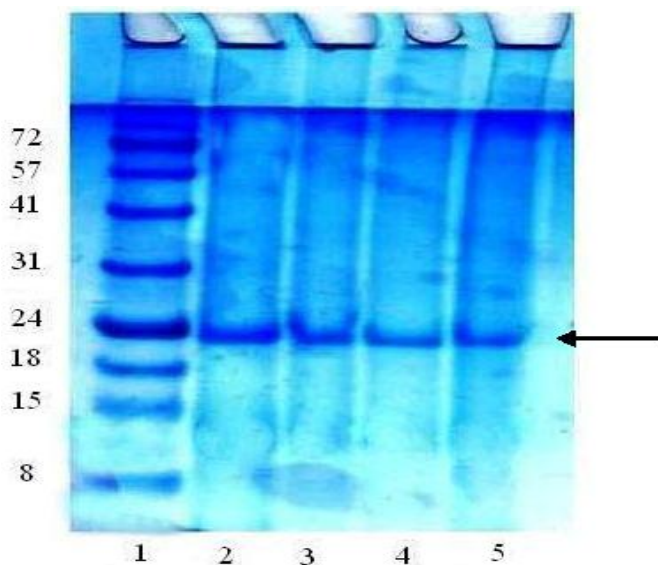
**Рис. 4.** Ионообменная хроматография объединенной фракции, проявившая 1,3-β-глюкозидазную активность на колонке (1,5x15 см) в линейном градиенте 0-1,5M NaCl

1, 2, 3, 4 peaks having 1,3-β-glucosidase activity

**Fig. 4.** Ion-exchange chromatography combined fractions, showed 1,3-β-glucosidase activity column (1,5x15 cm) in a linear gradient of 0-1,5M NaCl

Во всех разделенных фракциях определяли целлюлолитическую активность к субстрату целлобиозу. Разделенные 4 белковые фракции обладали целлобиазной (1,3-β-глюкозидаза) активностью и обозначены как СВН-1, СВН-2, СВН-3 и СВН-4. Все 4 фракции имели удельную активность 2,60, 3,80, 4,3 и 3,0 ед/мг белка, соответственно. Содержание общего белка в каждой фракции составляло 805, 1300, 1500 и 1100 мкг/мл, что намного ниже ожидаемого. Все фракции, обладавшие целлобиазной (1,3-β-глюкозидазной) активностью, в объеме 5 мл были сконцентрированы путем лиофилизации и растворены в объеме 200 мкл.

SDS электрофорез проводили по методу Лэммли [9], как было описано ранее. По подвижности в сравнении со стандартными белками ферменты СВН-1, СВН-2, СВН-3 и СВН-4 имели молекулярную массу близкую к одинаковым размерам 24±1 кДа (рис. 5).



1 – маркер; 2, 3, 4, 5 – фермент 1,3-β-глюкозидазы 1, 2, 3, 4

**Рис. 5.** Электрофореграмма целлобиаза активных фракций

1 – marker; 2, 3, 4, 5 – enzyme 1,3-β-glucosidase activity 1, 2, 3, 4

**Fig. 5.** Electrophoregram of cellobiase active fractions

Эти данные свидетельствуют о том, что при подобранных условиях штамм *T. harzianum* B1 способен синтезировать множество молекулярных форм 1,3-целлобиазы. Известно, что целлобиазы – это разновидность β-глюкозидаз, обладающих узкой специфичностью и гидролизующих только целлобиозу. Целлобиазы гидролизуют целлобиозу с сохранением аномерной конфигурации агликона, причем гидролиз, как правило, сопровождается трансгликозилированием [19, 20]. Молекулярная масса целлобиаз варьирует в широких пределах, например, в гомогенном состоянии получены целлобиазы с молекулярной массой около 50 кДа и молекулярной массой 100-300 кДа. Многие β-глюкозидазы способны гидролизовать, наряду с целлобиозой, также и олигосахариды с более высокой СП. Причем обычно их каталитическая активность уменьшается с увеличением длины олигосахарида. Следует отметить, что трансгликозилирование обычно проявляется в заметной степени при достаточно высоких концентрациях акцептора [21, 22].

Одной из важных характеристик ферментных препаратов являются pH и температурные оптимумы целевой активности, а также их стабильность при различных параметрах. Эти параметры во многих случаях являются ключевыми при выборе ферментов для различных биотехнологических процессов. Влияние температуры и pH среды на активность ферментов 1,4-β-глюканазы и 1,3-β-глюкозидазы в субстратах КМЦ и целлобиозы было исследовано в пределах температуры от 30°C до 80°C, при pH среды 3,0-10,0, при использовании 50 мМ ацетатного буфера. Максимальная активность и стабильность ферментов 1,4-β-глюканазы и 1,3-β-глюкозидазы наблюдалась при pH 3,0-5,0. Из рисунков 6 и 7 видно, что 1,4-β-глюканазы и 1,3-β-глюкозидазы проявляли максимальную активность при pH 4,8.

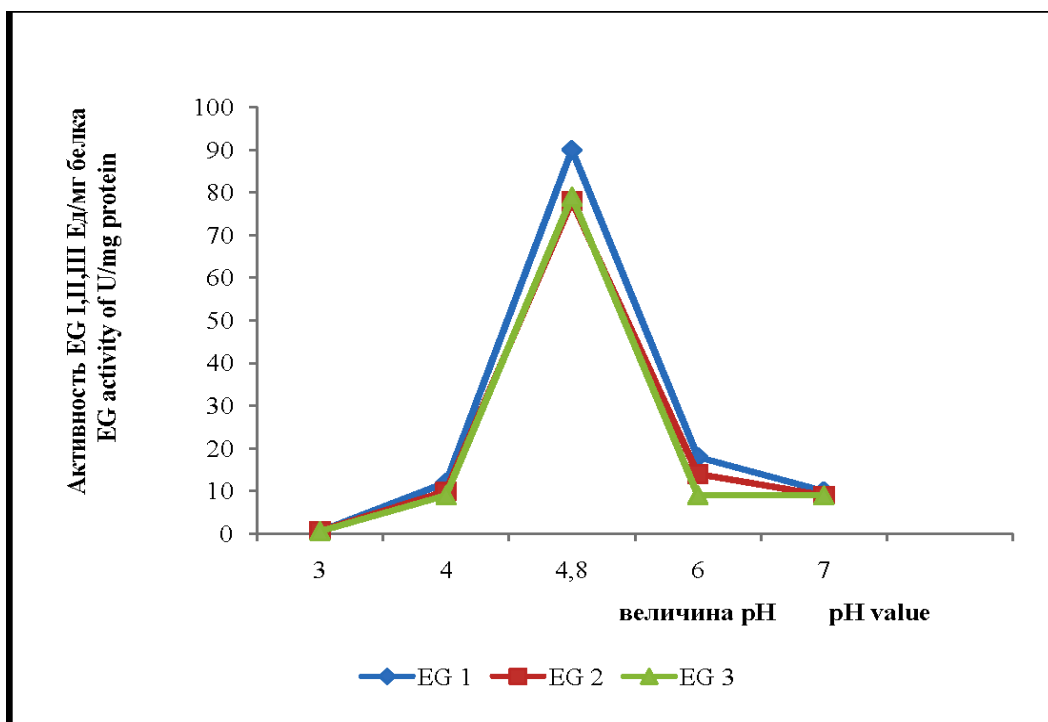


Рис. 6. Влияние pH среды на ферментативную активность 1,4-β-глюканазы 1, 2, 3

Fig. 6. Effect of pH on enzyme activity 1,4-β-glucanase 1, 2, 3

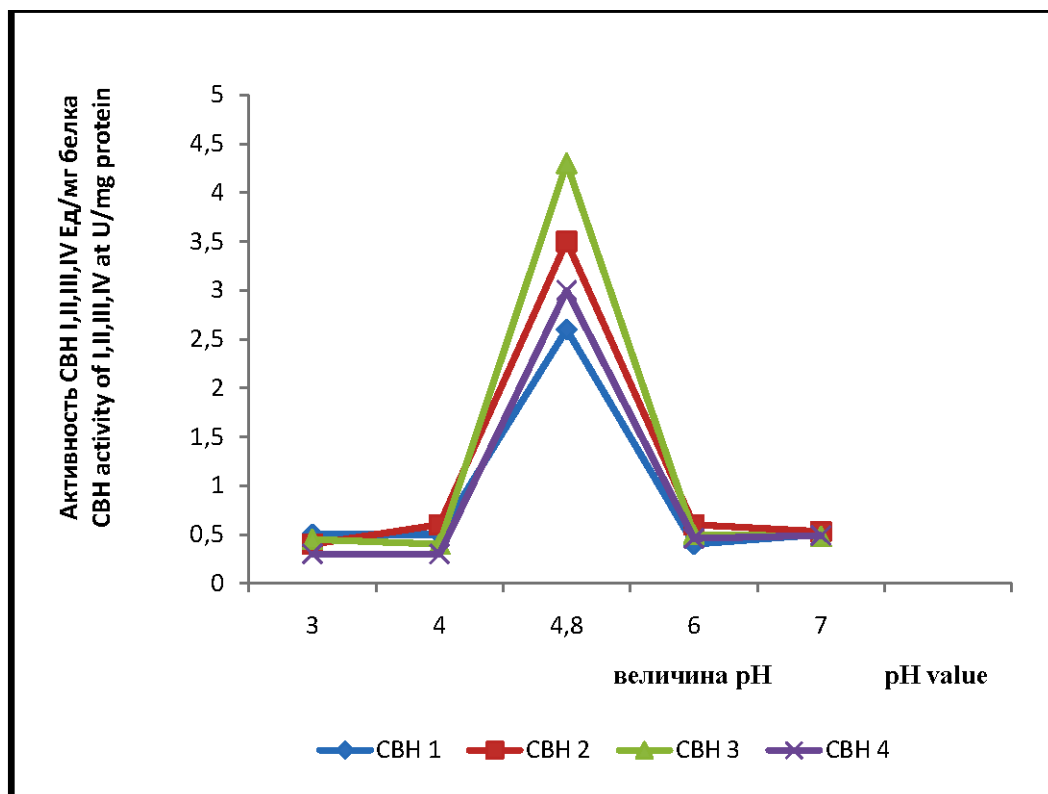
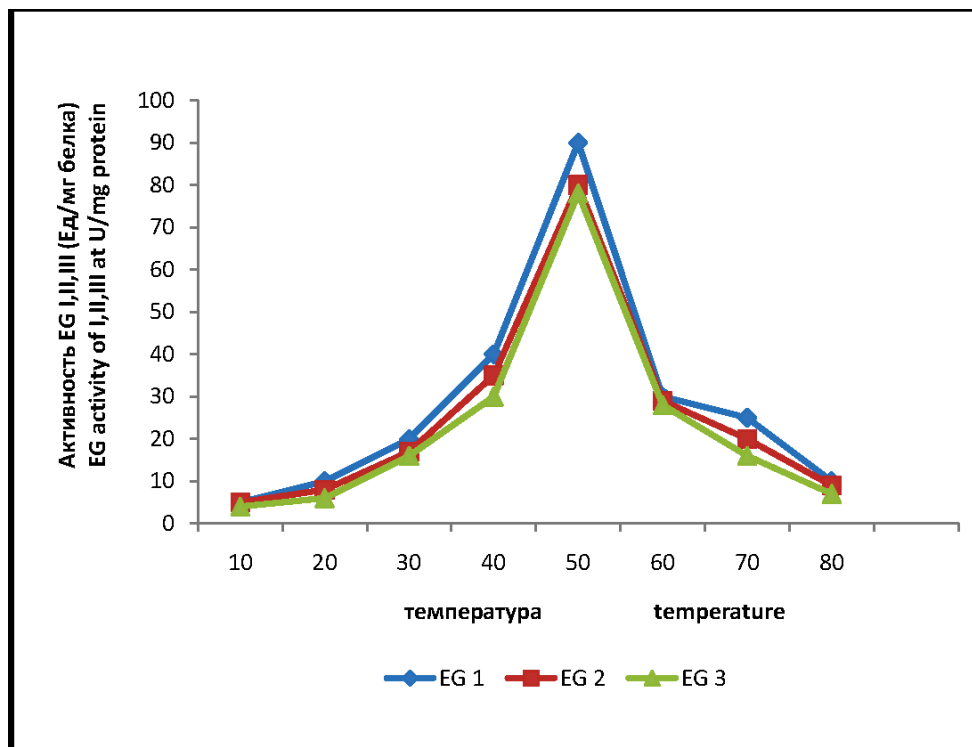


Рис. 7. Влияние pH среды на ферментативную активность 1,3-β-глюкозидазы 1, 2, 3, 4



**Fig. 7.** Effect of pH on enzyme activity of 1,3- $\beta$ -glucosidase 1, 2, 3, 4

Влияние температуры на активность ферментов 1,4- $\beta$ -глюканазы и 1,3- $\beta$ -глюкозидазы проверяли при температуре 50°C в течение 4 часов. Уменьшение полной активности ферментов наблюдали после 30 мин при температурах 60-70°C (рис. 8 и 9).



**Рис. 8.** Влияние температуры на ферментативную активность 1,4- $\beta$ -глюканазы 1, 2, 3

**Fig. 8.** Effect of temperature on enzyme activity of 1,4- $\beta$ -glucanase 1, 2, 3

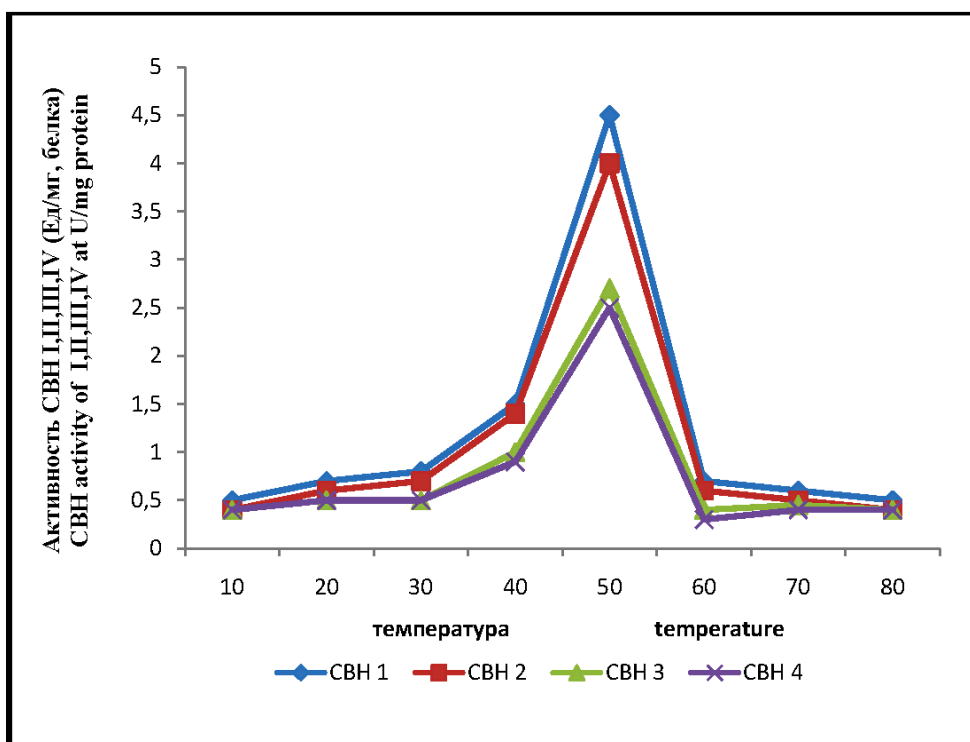


Рис. 9. Влияние температуры на ферментативную активность 1,3-β-глюкозидазы 1, 2, 3, 4

Fig. 9. Effect of temperature on enzyme activity of 1,3-β-glucosidase 1, 2, 3, 4

В ряде случаев ионы металлов ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) выполняют функции простетических групп ферментов, или служат акцепторами и донаторами электронов, или выступают в качестве электрофилов либо нуклеофилов, сохраняя реактивные группы в необходимой ориентации. В других случаях они способствуют присоединению субстрата к активному центру и образованию фермент-субстратного комплекса. Иногда металл соединяется с субстратом, образуя истинный субстрат, на который действует фермент. Эффект ионов металлов на целлюлолитическую активность ферментов 1,4-β-глюканазы и 1,3-β-глюкозидазы был изучен в присутствии одно- и двухвалентных ионов металлов K, Na, Fe, Mg и Mn. В буферной среде, содержащей ионы металлов до 10 мМ KCl, NaCl, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> и MnSO<sub>4</sub>, после инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре (при субстратах КМЦ и целлобиозы) активность ферментов 1,4-β-глюканазы увеличилась на 10%, 6,65 мкг/мл, а 1,3-β-глюкозидазы – на 15%, 6,95 мкг/мл (рис. 10 и 11).

Анализ изложенных в работе экспериментальных данных свидетельствует, что важнейшим условием биооконверсии является глубокая деструкция (осахаривание) обрабатываемого субстрата.

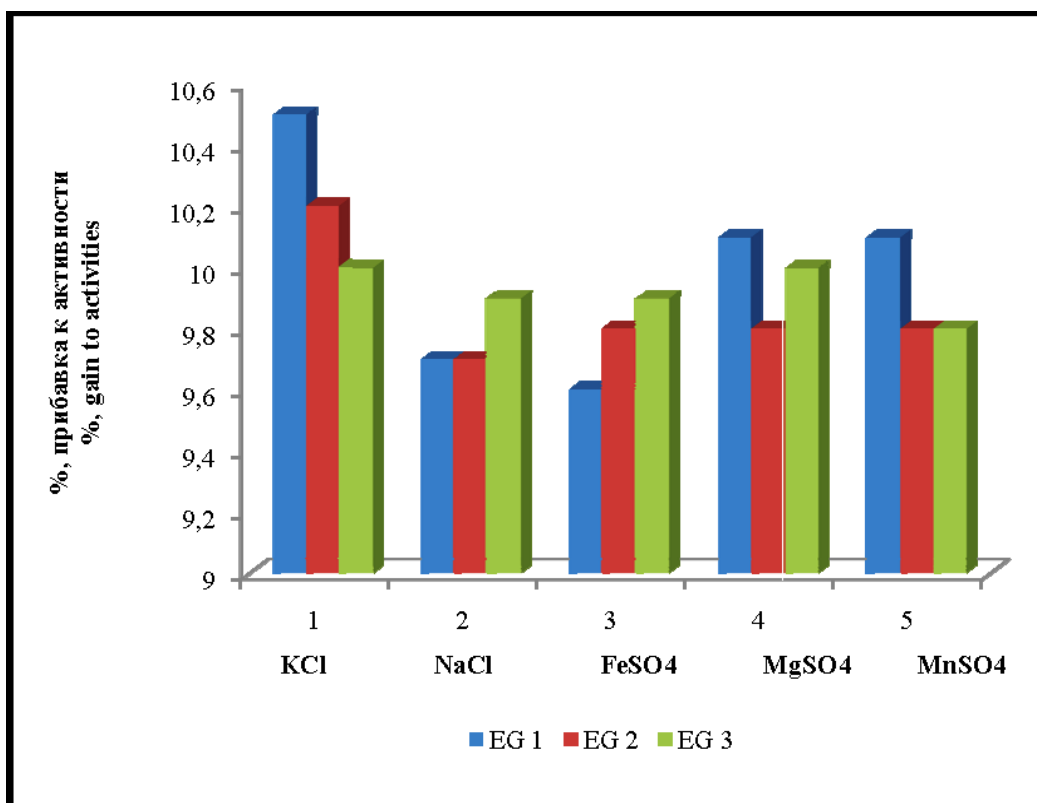
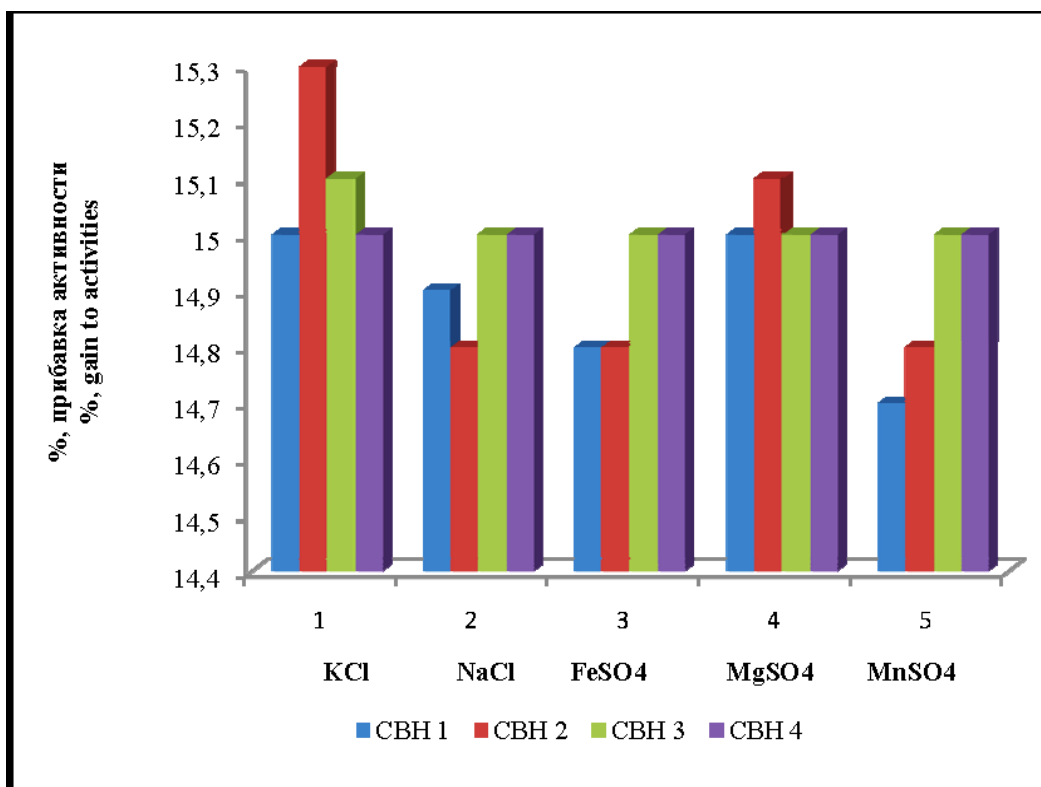


Рис. 10. Эффект ионов металлов на активность 1,4-β-глюканазы 1, 2, 3

Fig. 10. Effect of metal ions on activity of 1,4-β-glucanase 1, 2, 3



**Рис. 11.** Эффект ионов металлов на активность 1,3-β-глюкозидазы 1, 2, 3, 4

**Fig. 11.** Effect of metal ions on activity of 1,3-β-glycosidase 1, 2, 3, 4

Таким образом, исследуемый штамм *T. harzianum* B1 обладает способностью продуцировать комплекс высокоактивных целлюлаз, включающий эндоглюканазы, целлобиазы (β-глюкозидазы), что создает возможность получения активного комплекса ферментов. При необходимости возможно получение отдельных индивидуальных ферментов, гидролизующих основные компоненты клеточной стенки растений, осуществляющих биодegradацию целлюлозо- и гемицеллюлозосодержащих субстратов, в том числе отходов промышленности и сельского хозяйства. Эти ферменты осуществляют конверсию растительной биомассы и получение сахаров, биоэтанола в промышленности.

### Выражение благодарности

Авторы выражают благодарность профессору Сагдиевой М.Г. (Институт микробиологии АН РУз) за ценные советы в ходе выполнения работы и обсуждения результатов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия целлюлаз. Итоги науки и техники // ВИНТИ. Серия Биотехнология. – М.: Наука, 1988. – Т. 11. – С. 4-149.
2. Moloney A.P., S.I.McCrae, Wood T.M., Coughlan M.P. Isolation and characterization of the 1,4-beta-D-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii* // J. Biochem. – 1985. – Vol. 225. – P. 365-374.
3. Kanda T., Wakabayashi K., Nishizawa K. Synergistic action of two different types of endo-cellulase components from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) in the hydrolysis of some insoluble celluloses // J. Biochem. – 1976. – Vol. 79. – P. 997-1006.
4. Родионова Н.А. Ферментативное расщепление целлюлозы. Целлюлазы микроорганизмов / под ред. В.Л. Кретович. – М.: Наука, 1981. – С. 4-40.
5. Рабинович М.Л., Нгуен Ван вьет., Клесов А.А. Синергизм при совместном действии эндоглюканаз с высоким и низким сродством к целлюлозе // Прикл. биохимия и микробиол. – 1986. – Т. 22, №1. – С. 70-79.
6. Mandels M., Reese E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals // J. Bacteriol. – 1957. – Vol. 73. – P. 269-278.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
8. Somogyi M. Notes on sugar determination // J. Biol. Chem. – 1952. – Vol. 195. – P. 19-23.
9. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – №5257(227). – P. 680-685.
10. Ulker A., Sprey B. Characterization of an unglycosylated low molecular weight 1,4-beta-glucan-glucanohydrolase of *Trichoderma reesei* // FEMS Microbiol. Lett. – 1990. – Vol. 57, №3. – P. 215-219.
11. Hall J., Hazlewood G.P., Barker P.J., Gilbert H.J. Conserved reiterated domains in *Clostridium thermocellum* endoglucanases are not essential for catalytic activity // Gene. – 1988. – Vol. 15, №69 (1). – P. 29-38.
12. Langsford M.L., Gilkes N.R., Singh B., Moser B., Miller R.C.Jr., Warren R.A.J., Kilburn D.G. Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains // FEBS Lett. – 1987. – Vol. 225. – P. 163-167.
13. Wood T.M., McCrae S.I., Macfarlane C.C. The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase // J. Biochem. – 1980. – Vol. 189. – P. 51-65.
14. Labudova I., Farkas V. Endoglucanases by *Trichoderma reesei* QM9414 // Biochem. Biophys. Acta. – 1983. – Vol. 744. – P. 135-140.
15. Calza R.E., Irwin D.C., Wilson D.B. Purification and characterization of two β-1-4-endoglucanases from *Thermomonospora fusca* // J. Biochemistry. – 1985. – Vol. 24. – P. 7797-7804.
16. Kim C.-H. Characterization and substrate specificity of an endo-β-1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans* // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – P. 959-965.
17. Stewart J.C., Heptinstall J. Cellulase of *Aspergillus niger* // Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 160. – P. 264-274.

18. Wood T.M. and Mc Crae S.I. The cellulase of *T. koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase // *J. Biochem.* – 1978. – Vol. 171. – P. 61-72.

19. Румянцева Г.Н., Родионова Н.А. Целлюлазы микроорганизмов // Очистка и характеристика двух типов  $\beta$ -глюкозидаз; целлюлазы и арилглюкозидазы. – М.: Наука, 1981. – 344 с.

20. De Gussem R.L., Aerts G.M., Claeysens M., De Bruyne C.K. Purification and properties of an induced beta-D-glucosidase from *Stachybotrys atra* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1978. – Vol. 525. – P. 142-153.

21. Jeng W.Y., Wang N.C., Lin M.H., Lin C.T. et al. Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis* // *J. Struc. Biol.* – 2010. – Vol. 173(1). – P. 46-56.

22. Короткова О.Г. Получение целлюлазных комплексов с увеличенной осахаривающей способностью на основе рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum*: автореф. ... канд. хим. наук. – М.: МГУ, 2011. – 17 с.

## REFERENCES

1. Rabinovich M.L., Chernoglazov V.M., Klesov A.A. Klassifikatsiya cellulaz, ih rasprostranennost, mnojestvennie formi i mehanismi deystviya cellulaz [Classification of cellulase and their spreading multiple forms and mechanisms of the action cellulose]. *Itogi nauki i tekhniki. VINITI, ser. Biotehnologiya - Totals of the science and technology, series of biotechnology.* Moscow, Publ. Nauka, 1998, vol. 11, pp. 4-149.

2. Moloney A.P., S.I.McCrae, Wood T.M., and Coughlan M.P. Isolation and characterization of the 1,4-beta-D-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii*. *J. Biochem.*, 1985, vol. 225, pp. 365-374.

3. Kanda T., Wakabayashi K., Nishizawa K. Synergistic action of two different types of endo-cellulase components from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) in the hydrolysis of some insoluble celluloses. *J. Biochem.*, 1976, vol. 79, pp. 997-1006.

4. Rodionova N.A. Fermentativnoye rasshepleniye cellulozii. Cellulazi mikroorganizmov. [Enzymatic saccharification of cellulose. Cellulase of microorganisms]. Kretovich V.L. ed. Moscow, Publ. Nauka, 1981, pp. 4-40.

5. Rabinovich M.L., Nguen Van veet, Klesov A.A. Sinergizm pri sovmestnom deystvii endoglukanaz s visokim i nizkim srodstvom k sellulose [Synergism under joint action endoglucanase with high and low relationship to cellulose]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya – Applied Microbiology and Biochemistry*, 1986, vol. 22, no. 1, pp. 70-79.

6. Mandels M., Reese E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, 1957, vol. 73, pp. 269-278.

7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248-254.

8. Somogyi M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 1952, vol. 195, pp. 19-23.

9. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, no. 5257 (227), pp. 680-685.

10. Ulker A., Sprey B. Characterization of an unglycosylated low molecular weight 1,4-beta-glucan-glucanohydrolase of *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, vol. 57, no. 3, pp. 215-219.

11. Hall J., Hazlewood G.P., Barker P.J., Gilbert H.J. Conserved reiterated domains in *Clostridium thermocellum* endoglucanases are not essential for catalytic activity. *Gene*, 1988, vol. 15, no. 69(1), pp. 29-38.

12. Langsford M.L., Gilkes N.R., Singh B., Moser B., Miller R.C. Jr., Warren R.A.J., Kilburn D.G. Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 225, pp. 163-167.

13. Wood T.M., McCrae S.I., Macfarlane C.C. The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulose. *J. Biochem.*, 1980, vol. 189, pp. 51-65.

14. Labudova I., Farkas V. Endoglucanases by *Trichoderma reesei* QM9414. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1983, vol. 744, pp. 135-140.

15. Calza R.E., Irwin D.C. and Wilson D.B. Purification and characterization of two  $\beta$ -1-4-endoglucanases from *Thermomonospora fusca*. *J. Biochemistry*, 1985, vol. 24, pp. 7797-7804.

16. Kim C-H. Characterization and substrate specificity of an endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, pp. 959-965.

17. Stewart J.C., Heptinstall J. Cellulase of *Aspergillus niger*. *Methods Enzymol.*, 1988, vol. 160, pp. 264-274.

18. Wood T.M., McCrae S.I. The cellulase of *T. koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *J. Biochem.*, 1978, vol. 171, pp. 61-72.

19. Romyansea G.N., Rodionova N.A. Cellulasi mikroorganismov, razdel "Ochistka i harakteristika dvuh tipov  $\beta$ -glukozidaz; sellobiazi i arilglukozidazi" [Cellulase of microorganism, section "Purification and feature two types  $\beta$ -glucosidases, cellobiase and arilglucosidases"]. Moscow, Publ. Nauka, 1981, 344 p.

20. De Gussem R.L., Aerts G.M., Claeysens M., De Bruyne C.K. Purification and properties of an induced beta-D-glucosidase from stachybotrys atra. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, vol. 525, pp. 142-153.

21. Jeng W.Y., Wang N.C., Lin M.H., Lin C.T. et al. Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium Clostridium cellulovorans, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *J. Struc. Biol.*, 2010, vol. 173(1), pp. 46-56.

22. Korotkova O.G. Polucheniye cellulasnikh kompleksov s uvelichennoy osaharivayushey sposobnostyu na osnove rekombinantnih shtammov *Penicillium verruculosum*. Diss. Kand. Khim. Nauk [The Reception cellulose complex with increased saccharification ability on base recombinant strains of *Penicillium verruculosum*. Kand. Khim. Sci. Diss.]. Moscow, Publ. MGU, 2011, 17 p.

## **TRICHODERMA HARZIANUM B1 САҢЫРАУҚҰЛАҚТАН ЦЕЛЛЮЛОЛИТТИК ФЕРМЕНТТЕР БӨЛІП ШЫҒАРУ**

**Умаров Б.Р.<sup>1</sup>, Сағдиев Н.Ж.<sup>2</sup>, Ким А.Л.<sup>2</sup>, Инагамов У.К.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Өзбекстан Ғылым академиясының микробиология институты  
А. Қадыри. к-сі, 76, Ташкент, 100128, Өзбекстан

<sup>2</sup>Өзбекстан Ғылым академиясының А.С. Садыков атындағы биоорганикалық химия институты

Мирзо Ұлықбек к-сі, 83, Ташкент, 100125, Өзбекстан  
b.r.umarov@mail.ru

### **ТҮЙІН**

2%-дық бидай кебегі бар ортада көміртектің бірден-бір көзі ретінде кеңінен өсіру жағдайында әткеншекте 200 айн./мин., 30±1°C температура кезінде жергілікті штамм *Trichoderma harzianum B1* 5 тәулік ішінде целлюлолиттік ферменттер түзіп шығарды. Өсірінді сұйықтығында жасушадан тыс нәруыздар және целлюлаздық кешеннің ферменттері зерттелді. Алуан түрлі жүйелер хроматографиясының және G-75 сефадексіндегі түрлі гель-тасымалдаушылардың көмегімен Акрилекс П-60 пен ион айырбастаушы хроматография ДЭАЭ Тойперл 650М гелінде целлюлолиттік ферменттер бөлініп шығарылды және тазартылды. Бөлініп шығарылған нәруыздар мен ферменттердің молекулалық массасы белгілі молекулалық массаларға ие маркерлік нәруыздарды пайдалана отырып, 0,1% SDS қатысуымен 12% ПААГ электрофорездің көмегімен белгіленді. Үш изоформаның молекулалық массасы эндо-1,4- $\beta$ -глюканазаның (ЕС 3.2.1.4), EG 1, EG 2, және EG 3 ММ 35±1 кДа-ға сәйкес болды, целлюлолиттік белсенділігі 90,4, 77,52 және 78,92 бірл/мг нәруыз, және целлюлаздың төрт изоформасы (1,3- $\beta$ -глюкозидазалар, ЕС 3.2.1.21), СВН 1, СВН 2, СВН 3 және СВН 4 - ММ 24±1 кДа-ға үйлесті, целлюлолиттік белсенділігі 2,60, 3,80, 4,3, және 3,0 бірл/мг нәруыз. Зерттелетін ферменттердің целлюлолиттік белсенділігіне және тұрақтылығына температураның, рН ортаның металдар иондарының әсері зерттелді. Оптимальные температуры Эндо-1,4- $\beta$ -глюканазаның және целлюлазаның (1,3- $\beta$ -глюкозидазаның) оңтайлы температуралары были равны 50°C-ге тең және рН 4,8 шегінде болды. Металдардың бір- және екі валентті иондарының К, Na, Fe, Mg және Mn әсері аралық ортада 1,4- $\beta$  глюканаза ферменттерінің белсенділігін 10%-ға және 1,3- $\beta$  глюкозида ферменттерінікін 15%-ға арттырды.

Негізгі сөздер: *Trichoderma harzianum B1*, изоформы эндо-1,4- $\beta$ -глюканаза, 1,3- $\beta$ -глюкозидаза изоформалары.