

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДНОГО И АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЛЮЛАЗ ГРИБАМИ *LENTINUS TIGRINUS* VKM F-3616 D И *TRICHODERMA VIRIDE* VKM F-1131

Е. А. Левина, Н. А. Атыкян, В. В. Ревин

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»

Поступила в редакцию 07.12.2015 г.

Аннотация. Исследована целлюлазная активность грибов *Lentinus tigrinus* VKM F-3616D и *Trichoderma viride* F-1131. В процессе глубинного культивирования было изучено влияние источников углеродного и азотного питания в различных концентрациях на биосинтез целлюлаз исследуемыми грибами. Для данных продуцентов оптимальным источником углерода является карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) в концентрации 1.5%, а оптимальным источником азота - дрожжевой экстракт в концентрации 0.2%.

Ключевые слова: глубинное культивирование, целлюлазы, *Lentinus tigrinus*, *Trichoderma viride*, источник азота, источник углерода

Abstract. Cellulase activity of fungi *Lentinus tigrinus* VKM F-3616D and *Trichoderma viride* F-1131 was studied. The main purpose of this study is exploration of the effect of carbon and nitrogen sources in different concentrations on the production of cellulases by studied fungi using the submerged cultivation. The optimum carbon source for the production of cellulases by *Lentinus tigrinus* VKM F-3616D and *Trichoderma viride* F-1131 was carboxymethylcellulose (CMC) in a concentration of 1.5%, and the optimum nitrogen source - yeast extract in a concentration of 0.2%.

Keywords: submerged cultivation, cellulase, *Lentinus tigrinus*, *Trichoderma viride*, nitrogen source, carbon source

Целлюлазы (целлюлолитические ферменты) – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз β -1,4 – гликозидных связей в молекуле целлюлозы с образованием набора олигосахаридов различной степени полимеризации вплоть до мономера – глюкозы [1,2]. Гидролиз целлюлозы осуществляется целлюлазными полиферментными системами [3].

Целлюлазный комплекс состоит из ферментов четырех типов: эндо-1,4- β -глюканазы (1,4- β -глюкан-глюканогидролазы, КФ 3.2.1.4), которая может неупорядочено гидролизовать в целлюлозе β -1,4 связи и образовывать помимо целлоолигосахаридов глюкозу и целлотриозы;

экзо-1,4- β -глюканазы (экзоцеллобиогидролазы или 1,4- β -D-глюкан-целлобиогидролазы, КФ 3.2.1.91) - это целлобиогидролаза, которая отщепляет целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов; экзо-1,4- β -глюкозидазы (1,4- β -D-глюкан-глюкогидролазы, КФ 3.2.1.74) - это экзо-1,4- β -глюкозидаза, которая отщепляет с концов глюкозные остатки; целлобиазы (β -глюкозидаза или β -D-глюкозид-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.21) - это экзо- β -глюкозидаза, или целлобиаза, которая отщепляет концевые нередуцирующие остатки β -D-глюкозы [4,5,6].

В природе целлюлазы синтезируются грибами, бактериями или актиномицетами [7]. Наиболее же эффективными продуцентами целлюлаз

выступают грибы, относящиеся к различным видам: *Aspergillus amstelodamy*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii* и многие другие [8].

Целлюлазы имеют широкое промышленное применение в различных сферах деятельности человека: в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, получении биоэтанола, пивоварении, производстве тканей, моющих средств, животных кормов, целлюлозно-бумажной промышленности и т. д. [9,10,11,12,13].

В связи с активным интересом, связанным с применением целлюлаз в различных сферах, большинство исследователей по всему миру работают над теми или иными аспектами исследования целлюлаз [14,15].

Так синтез низкого количества целлюлаз всегда был одной из основных проблем, в связи с этим предпринимались многочисленные попытки увеличения синтеза ферментов путем применения многосторонних подходов, которые включают в себя использование более современных биотехнологических технологий, использование дешевого сырья в качестве субстратов при производстве ферментов, использование биоинженерных методов для селекции микроорганизмов и т. д. [16].

Промышленное производство целлюлаз требует определенных знаний в области управления процессом их биосинтеза. Это связано с тем, что существует множество факторов, которые оказывают существенное воздействие на процесс их получения. Как известно, биосинтез целлюлаз протекает согласно механизмам индукции и репрессии, поэтому необходимо учитывать данные аспекты в процессе разработки технологии их производства [17].

Одним из ключевых факторов, оказывающих воздействие на биосинтез целлюлаз, является подбор питательной среды, так как различные комбинации питательных компонентов в ее составе могут оказывать существенное влияние на процесс биосинтеза ферментов [18].

В связи с этим нами была проведена работа по изучению влияния источников углерода и азота в различных концентрациях на биосинтез целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* F-3616D и *Trichoderma viride* F-1131.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе были использованы штаммы грибов из лабораторной коллекции кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарёва»: *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D и *Trichoderma viride* ВКМ F-1131. Культуры грибов поддерживали на агаризованной среде Чапека – Докса при 4 °С после выращивания их в течение 7 суток при 28 °С.

Для глубинного культивирования продуцентов использовали жидкую среду Мэнделя – Вэбера [19], следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.4; KH_2PO_4 – 2.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.3; CaCl_2 – 0.3; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.0014; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.0016; CoCl_2 – 0.002; карбоксиметилцеллюлоза – 10; твин 80 – 2 мл. Глубинное культивирование продуцентов осуществляли в конических колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл среды, на круговых качалках со скоростью вращения 200 об/мин при 28 °С в течение 5-7 суток. Полученную в результате культуральную жидкость центрифугировали при 8 000 об/мин в течение 10 мин [20]. В полученном супернатанте определяли целлюлолитическую активность.

Для определения авицелазной (экзоглюканазной) активности в качестве субстрата использовали микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ). В пробирку вместимостью 10 см³ вносили 100 мг МКЦ, приливали 1 см³ 0.1М ацетатного буфера с рН 5.0 и 1 см³ фильтрата культуральной жидкости. Смесь инкубировали 60 мин при 50 °С. Полученные гидролизаты фильтровали и определяли в них содержание редуцирующих сахаров методом с применением 3,5-динитросалициловой кислоты [21]. За единицу авицелазной (экзоглюканазной) активности принимали такое количество фермента, которое в принятых стандартных условиях (рН 5.0, температура инкубации 50 °С, продолжительность гидролиза 1 ч) катализирует гидролиз микрокристаллической целлюлозы с образованием 1 микромоля редуцирующих сахаров.

Для определения КМЦ-азной (эндоглюканазной) активности в качестве субстрата использовали 1 %-ный раствор Na-КМЦ в 0.1М ацетатном буферном растворе с рН 5.0. В пробирку объемом 10 см³ помещали 1 мл 1 %-ного раствора Na-КМЦ в 0.1М ацетатном буферном растворе с рН 5.0 и 1 см³ исследуемого фильтрата культуральной жидкости, перемешивали и инкубировали при 50 °С в течение 10 мин. Полученные гидролизаты фильтровали и определяли в них содержание редуцирующих сахаров методом с применением

3,5-динитросалициловой кислоты [22]. За единицу КМЦ-азной (эндоглюканоазной) активности принимали такое количество фермента, которое в принятых стандартных условиях (рН 5,0, температура инкубации 50 °С, продолжительность гидролиза 10 минут) катализирует гидролиз целлюлозы с образованием 1 микромоля редуцирующих сахаров.

Для исследования влияния различных источников углеродного питания и их концентраций на биосинтез целлюлаз процесс культивирования продуцентов осуществляли на среде Мэндела - Вэбера с использованием различных источников углерода (карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), глюкоза, сахароза, древесные опилки) в следующем диапазоне их концентраций – 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 % [22,23,24].

Для изучения влияния различных источников азотного питания и их концентраций на биосинтез целлюлаз процесс культивирования продуцентов осуществляли с использованием различных органических (мочевина, пептон, дрожжевой экстракт) и неорганических источников углерода ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃, NH₄Cl) в следующем диапазоне их концентраций – 0.1; 0.15; 0.2; 0.25; 0.3 % [23,24].

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel 2007. Находили среднее арифметическое и ошибку среднего по трем параллельным измерениям.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Источники углерода играют жизненно важную роль в метаболизме клеток и синтезе целлюлаз [25]. В связи с этим было проведено исследование по изучению их влияния на биосинтез целлюлаз грибами *L. tigrinus* и *T. viride*.

На первом этапе исследования был поставлен эксперимент по подбору оптимального источника углерода для биосинтеза целлюлаз исследуемыми грибами. Для этого было осуществлено культивирование продуцентов на средах, содержащих различные источники углерода (КМЦ, МКЦ, древесные опилки, глюкоза, сахароза) в концентрации 1% [22].

В результате проведения данного эксперимента были получены данные, отображенные на рисунке 1. Анализируя результаты, можно отметить, что наиболее оптимальными источниками углерода для биосинтеза целлюлаз грибами *L. tigrinus* и *T. viride* являются КМЦ и МКЦ. При этом следует заметить, что наибольший выход целлюлаз наблюдается при использовании в качестве источника углерода КМЦ: авицелазная (*L. tigrinus* – 3.71 Ед/мл, *T. viride* – 5.53 Ед/мл) и КМЦ-азная (*L. tigrinus* – 1.88 Ед/мл, *T. viride* – 1.74 Ед/мл) активности. Использование же в качестве источника углерода сахаров (сахароза, глюкоза) привело к низкому выходу целлюлаз: авицелазная (*L. tigrinus* – 0.098 Ед/мл, *T. viride* – 0.151 Ед/мл) и КМЦ-азная (*L. tigrinus* – 0.062 Ед/мл, *T. viride* – 0.094 Ед/мл) активности.

Полученную зависимость можно объяснить тем, что целлюлазы по своей природе являются индуцибельными ферментами [17]. Их биосинтез индуцируется только в присутствии соответствующего субстрата, т.е. целлюлозы, и, наоборот, репрессируется конечными продуктами [15]. Это в свою очередь и объясняет то, что именно целлюлозосодержащие источники углерода (МКЦ, КМЦ, древесные опилки) обеспечивают высокий выход целлюлаз при культивировании, а сахара (сахароза, глюкоза) – низкий выход.

Таким образом, выбор соответствующего субстрата имеет важное значение для эффективного синтеза целлюлаз. Это связано с тем, что субстраты служат не только источником углерода в

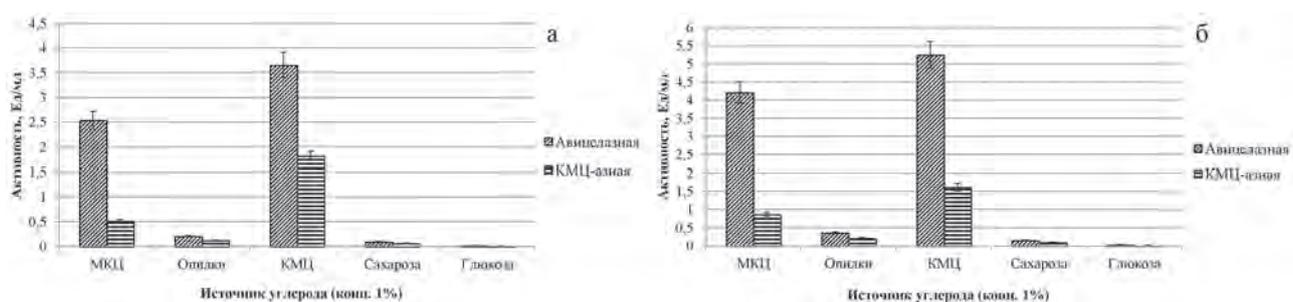


Рис 1. Исследование влияния различных источников углеродного питания на биосинтез целлюлаз: а) *Lentinus tigrinus* F-3616 D, б) *Trichoderma viride* F-1131

питательной среде, а также выступают в качестве необходимых индуцирующих соединений для микроорганизмов [26]. Так известно, что биосинтез целлюлолитических ферментов грибами зависит от регулирования доступных источников углерода. Доказано, что транскрипция целлюлазных генов подавляется в присутствии глюкозы. Также сообщалось, что синтез эндоглюканаз индуцируется КМЦ, но подавляется глюкозой [27].

В подтверждение полученных нами результатов ранее [28] было обнаружено, что предпочтительным субстратом для биосинтеза целлюлаз выступает КМЦ. Аналогичным образом, [29] сообщали, что на среде с глюкозой в качестве источника углерода биосинтез целлюлаз *T. harzianum* был незначителен, в присутствии же КМЦ [30] наблюдали высокие выходы целлюлаза.

В нашем исследовании, мы получили аналогичные результаты с очень низким выходом целлюлаз в присутствии глюкозы, в то время как КМЦ оказалась сильным индуктором целлюлаз.

На втором этапе исследования был поставлен эксперимент по подбору оптимальной концентра-

ции исследуемых источников углерода. Для этого было осуществлено культивирование продуцентов на средах, содержащих различные источники углерода (КМЦ, МКЦ, древесные опилки, глюкоза, сахара) в следующем диапазоне их концентраций – 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 % [24].

В результате проведения данного эксперимента были получены данные, отображенные на рисунках 2-3. Анализируя результаты можно сделать вывод, что при использовании различных источников углерода для биосинтеза целлюлаз данными грибами оптимальными являются следующие концентрации субстратов: КМЦ – 1.5%; МКЦ – 1.0%; древесные опилки – 1.5% (*L. tigrinus*) и 2.0% (*T. viride*), сахара – 1.0% и глюкоза – 1.0%.

Из представленных нами данных видно, что с увеличением концентрации сахаров от 1.0 до 1.5% синтез целлюлаз увеличивается, в то время как дальнейшее увеличение концентрации сахаров значительно снижает выход данных ферментов. Данный эффект можно объяснить тем, что высокая концентрация сахара в среде вызывает

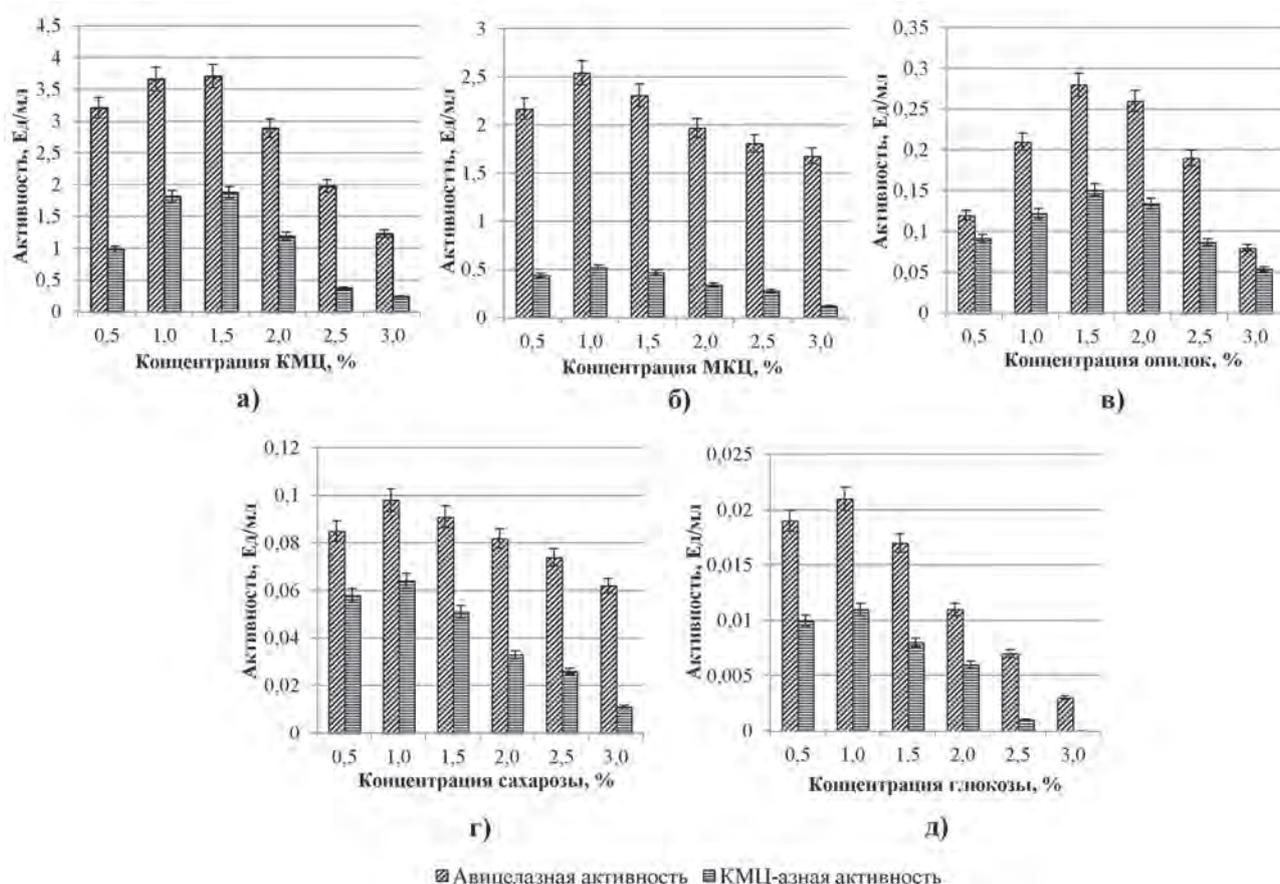


Рис. 2. Влияние источника углеродного питания и его концентрации на биосинтез целлюлаз грибом *Lentinus tigrinus* F-3616 D: а) КМЦ, б) МКЦ, в) древесные опилки, г) сахароза, д) глюкоза

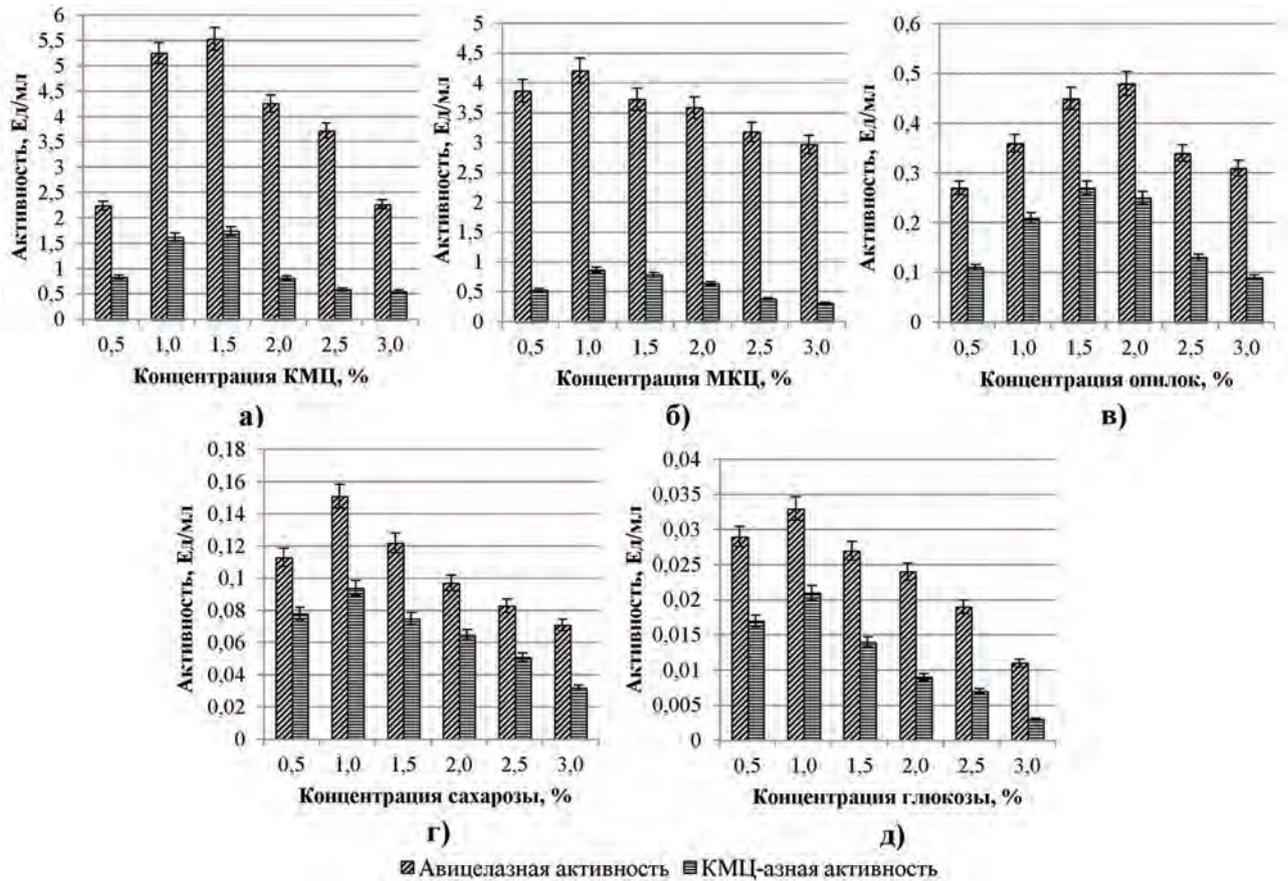


Рис. 3. Влияние источника углеродного питания и его концентрации на биосинтез целлюлаз грибом *Trichoderma viride* F-1131: а) КМЦ, б) МКЦ, в) древесные опилки, г) сахароза, д) глюкоза

репрессию биосинтеза целлюлаз продуцентами [31]. Отличие же в оптимальных концентрациях различных субстратов для данных продуцентов можно объяснить в первую очередь различиями в процессах метаболизма данных микроорганизмов, а также различиями в составе их ферментативных комплексов.

Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее оптимальным источником углерода, способствующим максимальному биосинтезу целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D и *Trichoderma viride* F-1131, является КМЦ в концентрации 1.5% для обоих продуцентов.

Далее были проведены исследования по изучению влияния различных источников азотного питания и их концентраций на биосинтез целлюлаз грибами *L. tigrinus* и *T. viride*. Как известно, азот является основной составляющей протоплазмы и строительного блока ферментов [32], поэтому присутствие его в среде в более доступной форме оказывает существенное влияние не только на прирост биомассы продуцентов, но и на биосинтез целлюлаз.

На первом этапе данного исследования был поставлен эксперимент по подбору оптимального источника азота для биосинтеза целлюлаз исследуемыми грибами. Для этого было осуществлено культивирование продуцентов на средах, содержащих различные источники азота (дрожжевой экстракт, пептон, мочевины, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl) в концентрации 0.1%. В результате проведения данного эксперимента были получены данные, отраженные на рисунке 4.

Анализируя результаты, можно отметить, что наиболее оптимальными источниками азота для биосинтеза целлюлаз грибами *L. tigrinus* и *T. viride* являются дрожжевой экстракт и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. При этом следует отметить, что наибольший выход целлюлаз наблюдается при использовании в качестве источника азота дрожжевого экстракта: авицелазная (*L. tigrinus* – 3.49 Ед/мл, *T. viride* – 5.41 Ед/мл) и КМЦ-азная (*L. tigrinus* – 1.61 Ед/мл, *T. viride* – 1.54 Ед/мл) активности. Использование же неорганических источников азота (NaNO_3 , NH_4Cl) привело к низкому выходу целлюлаз: авицелазная (*L. tigrinus* – 2.97 Ед/мл, *T. viride* – 4.36 Ед/мл) и КМЦ-азная (*L. tigrinus* – 1.22 Ед/мл, *T. viride* – 1.35 Ед/мл) активности.

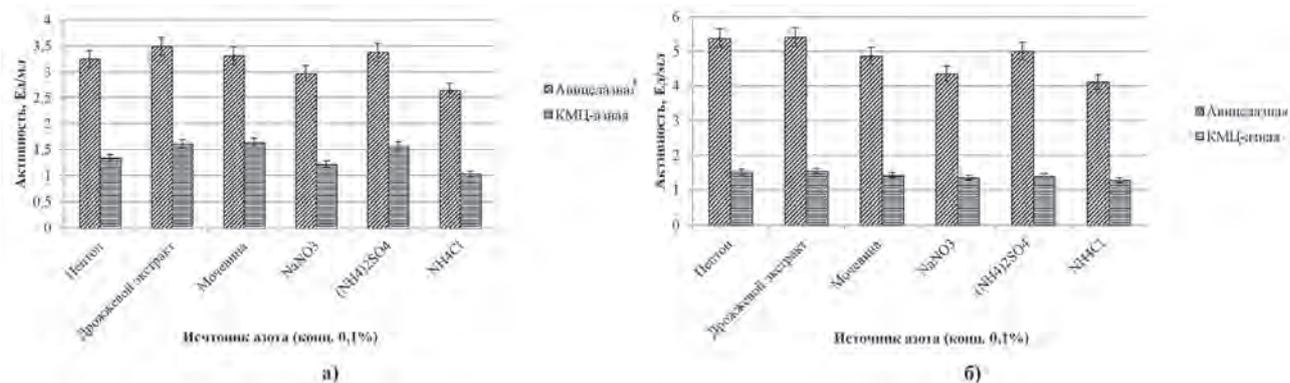


Рис. 4. Исследование влияния различных источников азотного питания на биосинтез целлюлаз грибами: а) *Lentinus tigrinus* F-3616 D, б) *Trichoderma viride* F-1131

Таким образом, проанализировав полученные данные можно сделать вывод, что различные источники азота оказывают существенное влияние на биосинтез целлюлаз исследуемыми грибами. Проведенные нами исследования показали, что наиболее предпочтительными для биосинтеза целлюлаз среди органических источников азота является дрожжевой экстракт, а неорганических – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Данные результаты нашли свое подтверждение в работах других исследователей [24, 33, 34], которые сообщали о том, что высокий вы-

ход целлюлаз был получен при использовании органических источников азота, таких как дрожжевой экстракт, пептон и неорганических – сульфат аммония.

Однако, следует отметить, что несмотря на то, что использование органических источников азота позволяет получить больший выход целлюлаз, с экономической точки зрения для промышленного получения ферментов более предпочтительно использовать неорганические источники азота из-за их более низкой стоимости [25].

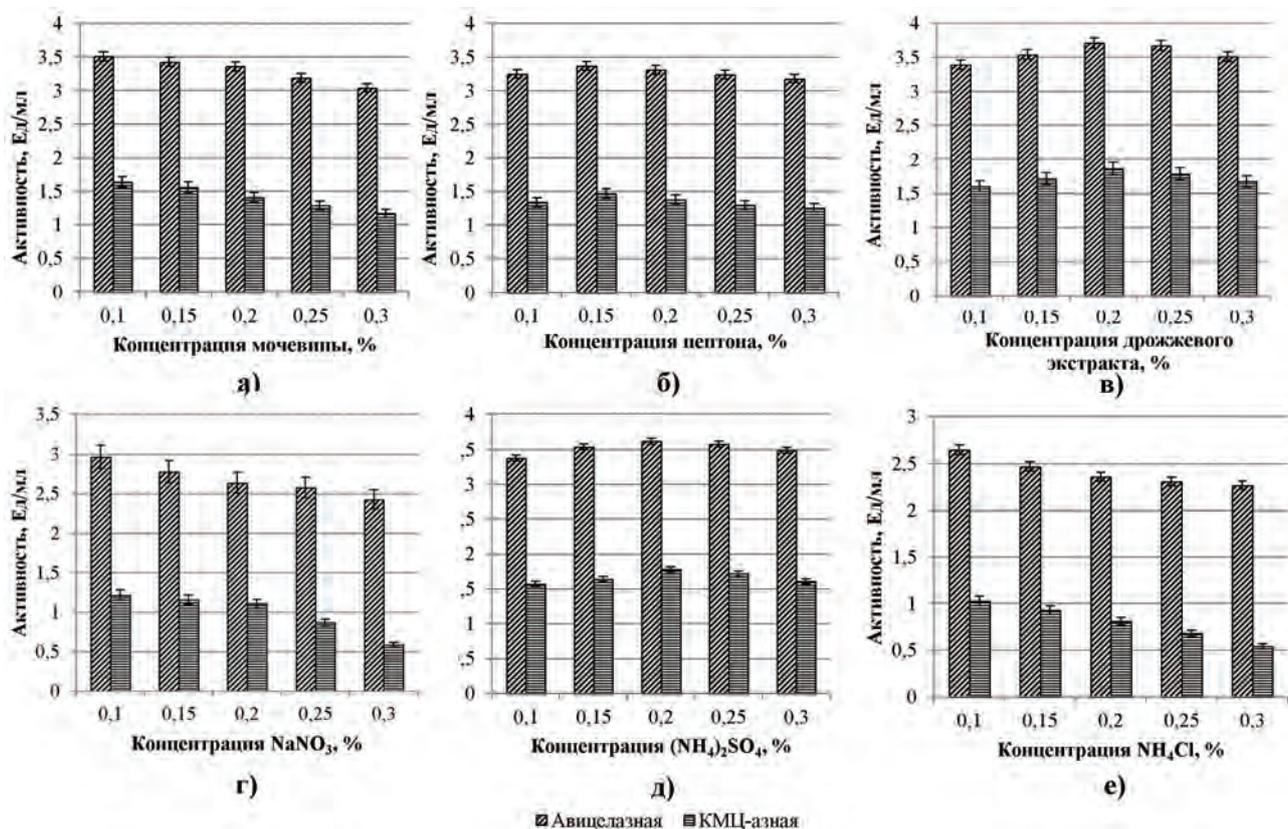


Рис. 5. Влияние источника азотного питания и его концентрации на биосинтез целлюлаз грибом *Lentinus tigrinus* F-3616 D: а) мочевины, б) пептон, в) дрожжевой экстракт, г) NaNO_3 , д) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, е) NH_4Cl

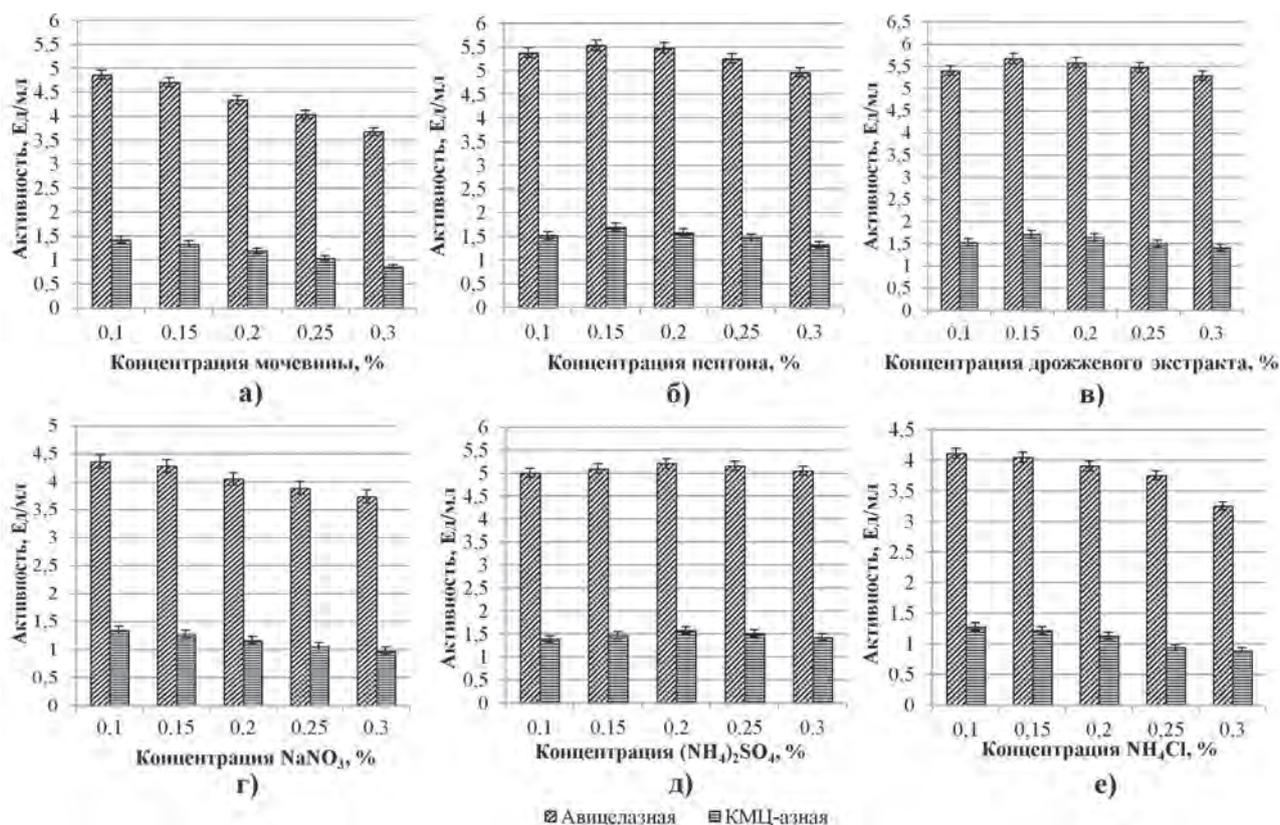


Рис. 6. Влияние источника азотного питания и его концентрации на биосинтез целлюлаз грибом *Trichoderma viride* F-1131: а) мочевина, б) пептон, в) дрожжевой экстракт, г) NaNO₃, д) (NH₄)₂SO₄, е) NH₄Cl

На втором этапе исследования был поставлен эксперимент по подбору оптимальной концентрации исследуемых источников азота. Для этого было осуществлено культивирование продуцентов на средах, содержащих различные источники азота (дрожжевой экстракт, пептон, мочевина, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl) в следующем диапазоне их концентраций – 0.1; 0.15; 0.2; 0.25; 0.3 %. В результате проведения данного эксперимента были получены данные, отображенные на рисунках 5-6.

Анализируя полученные результаты (рисунки 5-6), можно сделать вывод, что при использовании различных источников азота для биосинтеза целлюлаз данными грибами оптимальными являются следующие их концентрации: дрожжевой экстракт – 0.2% (*L. tigrinus*) и 0.15% (*T. viride*); пептон – 0.15%; мочевина – 0.1%, NaNO₃ – 0.1%, (NH₄)₂SO₄ – 0.2% и NH₄Cl – 0.1%.

Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее оптимальными источниками азота, способствующим максимальному биосинтезу целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D и *Trichoderma viride* F-1131, являются дрожжевой

экстракт и сульфат аммония в концентрации 0,2% для обоих продуцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharada R. Production of cellulase – a review / R. Sharada [et al.] // Int. J. Pharm. Biol. Sci. — 2013. — V.3, I.4. — P. 1070-1090.
2. Nwodo-Chinedu S. Effect of carbon sources on cellulase (E C 3.2.1.4) production by *Penicillium chrysogenum* PCL 501 / S. Nwodo-Chinedu [et al.] // Afr. J. Biochem. — 2007. — V.1, I.1. — P. 6-10.
3. Рабинович М.Л. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы / М.Л. Рабинович, М.С. Мельник // Успехи биологической химии. — 2000. — Т. 40, №2. — С. 205–266.
4. Рабинович М.Л. Целлюлазы микроорганизмов / М.Л. Рабинович, М.С. Мельник, А.В. Боллобова // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — № 38. — С. 355-373.
5. Debing J. Optimization of cellulase complex formulation for pea shrub biomass hydrolysis / J. Debing [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V.75. — P. 793-800.

6. Gori M.I. Production of carboxymethyl cellulase from local isolate of *Aspergillus species* / M.I. Gori, M.A. Malana // Pak. J. life Soc. Sci. — 2010. — V.8. — P. 1-6.
7. Ariffin H. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3 / H. Ariffin [et al.] // International Journal of Engineering and Technology. — 2006. — V.3, I.1. — P. 47-53.
8. Клёсов А.А. Способность целлюлаз к деградации целлюлозы как результат их эффективной адсорбции на субстрате: экспериментальное подтверждение и теоретическая интерпретация / А.А. Клёсов, В.М. Черноглазов, В.М. Рабинович [и др.] // Биохимия. — 2003. — Т.48. — С. 1411 - 1420.
9. Das A. Solid state fermentation of waste cabbage by *Penicillium notatum* NCIM NO-923 for production and characterization of cellulases / A. Das, U. Ghosh // J. Sci. Ind. Res. — 2009. — V. 68. — P. 714-718.
10. Demain A.L. Cellulase, clostridia, and ethanol / A.L. Demain, M. Newcomb, J.H.D. Wu. // Microbiology and Mol. Bio. Rev. — 2005. — V.69. — P. 124-154.
11. Yue F.E.N.G. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulose / F.E.N.G. Yue, X.J. Jian, Z.H.U. Li-wei // For Stud. China. — 2009. — V. 11. — P. 202-207.
12. Singhania R.R. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases / R.R. Singhania [et al.] // Enzyme Microb. Technol. — 2010. — V. 46. — P. 541-549.
13. Ibrahim M.M. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw / M.M. Ibrahim [et al.] // Agblevor. Carbohydr. Polym. — 2011. — V. 83. — P. 720-726.
14. Lynd L.R. Pretorius is microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. Van. // Microbiol. Mol. Biol. — 2002. — V.66. — P. 506-577.
15. Das A. Study on regulation of growth and biosynthesis of cellulolytic enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* ABK9 / A. Das [et al.] // Polish Journal of Microbiology. — 2013. — V.62., I.1. — P. 31-43.
16. Singhania R.R. Recent advances in solid-state fermentation / R.R. Singhania [et al.] // Biochem. Eng. J. — 2009. — V. 44. — P. 13-18.
17. Mach R.L. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma* / R.L. Mach, S. Zeilinger // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2003. — V. 60. — P. 515-522.
18. Sun X. The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions / X. Sun [et al.] // Enzyme Microb. Technol. — 2008. — V. 42. — P. 560-567.
19. Mandels M. Production of cellulases / M. Mandels, J. Weber // Adv. Chem. Series. — 1969. — V.95. — P. 391-414.
20. Jahangeer S. Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source / S. Jahangeer [et al.] // Pak. J. Bot. — 2005. — V.37, I.3. — P. 739-748.
21. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // Analytical Chemistry. — 1959. — V.31, I.3. — P. 426 - 428.
22. Sibtain A. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum* / A. Sibtain [et al.] // Pak. J. Bot. — 2009. — V.41, I.3. — P. 1411-1419.
23. Ramanathan G. Production and optimization of cellulose from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation / G. Ramanathan, S. Banupriya, D. Abirami // Journal of Scientific & Industrial Research. — 2010. — V.69. — P. 454-459.
24. Gautam S.P. Optimization of the medium for the production of cellulose by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation / S.P. Gautam [et al.] // International Journal of Environmental sciences. — 2010. — V.1, I.4. — P. 656-665.
25. Gautam S.P. Optimization for the production of cellulose enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi / S.P. Gautam [et al.] // Biotechnology Research International. — 2011. — V.1 — P. 1-8.
26. Haltrich D. Production of fungal xylanases / D. Haltrich [et al.] // Bioresour. Technol. — 1996. — V.58. — P. 137-161.
27. Ahmed S. Molecular cloning of cellulase genes from *Trichoderma harzianum* / S. Ahmed [et al.]. — The Netherlands: Bentham Science Publishers Ltd, 2005. — P. 73-75.
28. Lucas R. Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *Chalara* (*Syn. Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32 / R. Lucas [et al.] // J. Agri. Food Chem. — 2001. — V.49. — P. 79-85.
29. Malik N.N. Cellulase production by a locally isolated *Trichoderma sp* / N.N. Malik [et al.] // Pakistan journal of Biochemistry. — 1984. — V.17, I.1-2. — P. 57-68.

30. Niranjane A.P. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea* / A.P. Niranjane, P. Madhou, T.W. Stevenson // *Enzyme Microbial Technol.* — 2007. — V. 40. — P. 1464-1468.

31. Sherief A.A. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran / A.A. Sherief, A.B.El-Tanash, N. Atia // *Research Journal of Microbiology.* — 2010. — V. 5, I. 3. — P. 199-211.

32. Vyas A. Production and optimization of cellulases on pretreated groundnut shell by *Aspergillus terreus* AV49 / A. Vyas, D. Vyas, K.M. Vyas // *Journal*

of Scientific & Industrial Research. — 2005. — V.64. — P. 281-286.

33. Padmavathi T. Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus* / T. Padmavathi, V. Nandy, P. Agarwal // *European Journal of Experimental Biology.* — 2012. — V.2, I.4. — P. 1161-1170.

34. Kachlishvili E. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation / E. Kachlishvili [et al.] // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — V.22. - 391-397.

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва

Левина Е. А., аспирантка кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии факультета биотехнологии и биологии

Тел.: 8-927-970-47-14

E-mail: lyovinakate@gmail.com

Ogarev Mordovia State University
Levina E. A., post-graduate student of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry Department

Ph.: 8-927-970-47-14

E-mail: lyovinakate@gmail.com

Атыкян Н. А., кандидат биол. наук, доцент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии факультета биотехнологии и биологии

Тел.: +7 (8342) 324554

E-mail: kistig2@yandex.ru

Atykyan N. A., candidate of biological sciences, associate professor of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry Department

Ph.: +7 (8342) 324554

E-mail: kistig2@yandex.ru

Ревин В. В., доктор биол. наук, профессор, зав. кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии, декан факультета биотехнологии и биологии

Тел.: +7 (8342) 324554

E-mail: revinvv2010@yandex.ru

Revin V. V., doctor of biological sciences, professor, manager chair of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry Department, dean of Biotechnology and Biology Faculty

Ph.: +7 (8342) 324554

E-mail: revinvv2010@yandex.ru