

УДК 552.577:676.01: 577.152.3
DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.142

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА
TRICHODERMA REESEI M18 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ИЗ ЦЕЛЛОЛИГНИНА ТОРФА**

С.В. Гаврилов¹, асп.
А.В. Канарский¹, д-р техн. наук, проф.
Е.В. Скворцов², канд. биол. наук
Ю.В. Севастьянова³, канд. техн. наук, доц.

¹Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. Карла Маркса, д. 72, г. Казань, Россия, 420015; e-mail: ser-gavr@mail.ru

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, Россия, 420000; e-mail: eskvortsov@rambler.ru

³Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, д. 17, г. Архангельск, Россия, 163002; e-mail: j.sevastyanova@narfu.ru

Комплексная переработка торфа является важной хозяйственной проблемой. Методом электрохимического синтеза авторами получены хелатные соединения железа с гуминовыми кислотами, которые рекомендуется использовать в качестве кормовой добавки. В связи с образованием вторичного ресурса (целлолигнина) возникает проблема создания технологии его переработки на экономически эффективные продукты. Целлолигнин содержит большое количество целлюлозы, что делает его привлекательным сырьем для биотехнологической переработки микроорганизмами. Однако в целлолигнине содержится лигнин, препятствующий ферментативному гидролизу целлюлозы до простых сахаров, что обуславливает необходимость поиска способов его предварительной обработки. Целлолигнин может использоваться в качестве питательного субстрата для культивирования мицелиальных грибов рода *Trichoderma*, так как для них характерно проявление ксиланазной и целлюлазной активности, которая способствует ферментативному гидролизу целлолигнина. Цель работы – определение ферментативной активности при культивировании штамма мицелиального гриба *Trichoderma reesei* M18 на питательных средах из целлолигнина торфа. Для повышения ферментативной активности мицелиального гриба в питательную среду, содержащую целлолигнин торфа в твердой фазе, вводили мультиэнзимный комплекс, включающий целлюлазные и ксиланазные ферменты и редуцирующие вещества. Также в экспериментах целлолигнин обрабатывали бисульфитом натрия, после чего лигнин растворялся и клетчатка становилась более доступной для ассимилирования грибом. Установлена целесообразность культивирования мицелиального гриба *Trichoderma reesei* M18 на питательных средах из целлолигнина торфа, предварительно обработанного бисульфитом натрия. Показано, что внесение в питательную среду

Для цитирования: Гаврилов С.В., Канарский А.В., Скворцов Е.В., Севастьянова Ю.В. Ферментативная активность мицелиального гриба *Trichoderma reesei* M18 при культивировании на питательной среде из целлолигнина торфа // Лесн. журн. 2016. № 6. С. 142–152. (Изв. высш. учеб. заведений). DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.142

на основе целлолигнина, обработанного бисульфитом натрия, мультиэнзимных комплексов, содержащих целлюлазы и ксиланазы, способствует повышению ферментативной активности *Trichoderma reesei* M18, что увеличивает синтез белка и, соответственно, биомассы. Предварительная обработка целлолигнина торфа бисульфитом натрия рекомендуется для биоконверсии мицелиальным грибом *Trichoderma reesei* M18 с получением из биомассы адсорбента микотоксинов. Биомасса мицелиальных грибов *Trichoderma reesei* M18, выращенная на целлолигнине торфа, использована для получения адсорбентов микотоксинов, которые успешно испытаны *in vivo*.

Ключевые слова: торф, целлолигнин, обработка бисульфитом натрия, ксиланазы, целлюлазы, культивирование *Trichoderma reesei* M18.

Торф является гетерогенным по составу топливным и сырьевым ресурсом для промышленности. Основу торфа составляют остатки растений-торфообразователей – биополимеров растительного происхождения, продуктов распада этих растений, подвергшихся биоконверсии в природных условиях. Формирование торфа происходит за счет превращения части растений-торфообразователей в вещества сложной химической структуры под общим названием «гуминовые вещества». Кроме гуминовых веществ, в торфе содержится значительное количество неразложившихся остатков растений с сохранившимся клеточным строением и лигнин. Неорганическая часть представлена минеральными веществами разной природы, адсорбционными образованиями минералов с гуминовыми и другими веществами продуктов распада растений [3].

Экономическая эффективность переработки торфа возможна только при комплексном подходе с получением широкого ассортимента продуктов. Комплексный подход предполагает разделение торфа по фракционно-групповому составу и использование каждой фракции в качестве сырья при производстве конкретных продуктов. Торф по фракционно-групповому составу можно разделить на битумы, гуминовые вещества, легко- и трудногидролизуемые вещества (полисахариды) и лигнин [7].

Изучение процесса трансформации органических веществ растений при торфообразовании показывает, что скорость деструкции органических соединений определяется их способностью вступать в реакции и быть доступными для усвоения почвенными микроорганизмами. Углеводы являются преобладающим компонентом растений и составляют 40...80 % их органической массы. В результате торфообразования в первую очередь деструкции подвергаются легкогидролизуемые вещества – гемицеллюлозы. Целлюлоза торфа относится к трудногидролизуемым веществам. Не гидролизуемые в природных условиях вещества торфа гетерогенны по составу с преимущественным содержанием лигнина. Количество негидролизуемого остатка в торфе может достигать до 30 %.

Ранее проведенные авторами исследования показали возможность электрохимического синтеза хелатных соединений железа с гуминовыми кислота-

ми, которые целесообразно использовать в качестве кормовой добавки [2, 8, 10, 12].

При выделении гуминовых кислот из торфа образуется целлолигнин, разработка технологии переработки которого имеет практическую значимость. Одним из способов утилизации целлолигнина торфа может быть биотехнологический, в частности, с использованием мицелиальных грибов и последующим получением биопродуктов из биомассы.

Цель настоящей работы – определение эффективности культивирования штамма мицелиального гриба *Trichoderma reesei* M18 на питательных средах из целлолигнина торфа.

Для решения этой проблемы необходимо оценить эффективность культивирования мицелиального гриба на питательной среде, содержащей:

- целлолигнин торфа в твердой фазе;
- целлолигнин торфа в твердой фазе и целлюлолитические и ксиланазные ферменты;
- целлолигнин торфа, обработанного бисульфитом натрия;
- целлолигнин торфа, обработанного бисульфитом натрия, и целлюлолитические и ксиланазные ферменты.

Объект и методы исследований

В исследованиях использовался мицелиальный гриб *Trichoderma reesei* M18 предоставленный кафедрой биохимии и биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Культуру гриба выращивали в чашке Петри на картофельно-глюкозном агаре, имеющем следующий состав, г/л: отвар картофеля – 200, агар – 2, стрептомицин – 1. Инокулирование культуры гриба в питательную среду проводили петлей из чашки Петри.

Для культивирования гриба применяли целлолигнин торфа после выделения гуминовых веществ, которые извлекались методом щелочной экстракции 1 %-м раствором NaOH (гидромодуль 1:100) в течение 60 мин. После чего экстракт отделяли центрифугированием, оставшийся целлолигнин торфа промывали дистиллированной водой.

Питательная среда содержала целлолигнин торфа в твердой фазе (10 г/л в пересчете на сухое вещество) и минеральные вещества (K_2HPO_4 – 15,0; CaCl_2 – 0,3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г/л. pH питательной среды варьировался от 4 и 8.

Для повышения ферментативной активности мицелиального гриба в питательную среду вводили мультиэнзимный комплекс (МЭК), включающий целлюлазные и ксиланазные ферменты и редуцирующие вещества.

МЭК получен культивированием штамма гриба *T. reesei* M18 на питательной среде из фугата послеспиртовой барды по методике, представленной в работе [4]. Ксиланазная активность в МЭК – 37,3 IU/мл, целлюлазная – 0,29 FPU/мл. МЭК вводили в питательную среду в виде культуральной жидкости в количестве 10...30 % от общего объема питательной среды, ко-

торая содержала 2,6 г/л редуцирующих веществ. Полагалось, что присутствие в питательной среде целлюлазы и ксиланазы будет способствовать при ферментативном гидролизе целлюлозы образованию олигомерных углеводов, являющихся индукторами дополнительного синтеза грибами целлюлазы и ксиланазы [5].

Для повышения физиологической активности мицелиального гриба *T. reesei* M18, целлолигнин торфа также обрабатывали бисульфитом натрия, при котором лигнин растворяется, а клетчатка торфа становится более доступной для ассимилирования грибом. Бисульфитную обработку осуществляли при температуре 170 °С, продолжительности – 3 ч, расходе сульфита натрия (по Na₂O) – 15 % к абс. сухому веществу, гидромодуле 1:8, рН 6,5. Содержание редуцирующих веществ в бисульфитном щелоке составило 1,3 г/л, что указывало на частичную деструкцию целлюлозы. Содержание редуцирующих веществ в питательных средах, обусловленное необходимостью роста гриба, варьировалось.

Культивирование на питательных средах из целлолигнина торфа проводили периодическим глубинным способом при температуре (28 ± 1) °С от 6 до 15 сут при непрерывном перемешивании (частота вращения 130 об/мин) в темноте на шейкере-инкубаторе Innova 43R (США) в колбах вместимостью 250 мл. Объем питательной среды 50 мл.

Определение ксиланазной активности проводили в трех повторностях по методу König [13], целлюлазной активности – в трех повторностях по методу IUPAC [11].

Для определения редуцирующих сахаров к 120 мкл исследуемой пробы добавляли 1200 мкл дистиллированной воды и 600 мкл DNSA (3,5-динитросалициловая кислота). Пробы сначала выдерживали в течение 10 мин при температуре 100 °С, затем – 5 мин при 0 °С. После этого добавляли во все пробы по 6 мл дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Долю негидролизованной целлюлозы в целлолигнине определяли в трех повторностях по методу [14], белок в твердой фазе культуральной жидкости – методом элементного анализа на анализаторе EuroEA-3000 (Euro Vector, Италия). Стандарт – стрептоцид (C₆H₈O₂N₂S).

Для статистической обработки результатов использовали программу Excel. Для сравнения применяли интервальные оценки. Уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Анализ результатов, полученных при культивировании штамма гриба *T. reesei* M18 на питательной среде из целлолигнина торфа в твердой фазе, показывает, что данная культура в рассматриваемых условиях не проявляет существенной физиологической активности. Проявление незначительной ксиланазной и целлюлазной активностей вызывает гидролиз целлюлозы до про-

стых сахаров (глюкозы). Однако этого количества редуцирующих веществ не достаточно для интенсивного роста культуры, что подтверждается следовыми количествами белка (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Влияние pH, продолжительности культивирования и МЭК на ферментативную активность штамма мицелиального гриба *T. reesei* M18 на питательной среде из целлолигнина торфа

pH	Расход культуральной жидкости с МЭК, об. % от объема питательной среды	Продолжительность культивирования, сут	Редуцирующие вещества, г/л	Активность		Доля негидролизованной целлюлозы, %	Содержание белка в твердой фазе культуральной жидкости, %
				ксилазная, IU/мл	целлюлазная, FPU/мл		
4	0	6	– /Следы	Следы/0,10	Следы/0,001	95,20	Следы
8	0	6	– /0,01	Следы/0,11	Следы/0,001	96,50	Следы
4	0	9	– /Следы	Следы/0	Следы/Следы	97,01	Следы
8	0	9	– /0,03	Следы/0,12	Следы/0,002	94,20	Следы
4	30	6	0,86/1,12	11,2/27,28	0,09/0,295	13,26	7,7
8	30	6	0,86/4,05	11,2/40,46	0,09/0,454	10,11	16,5
4	30	9	0,86/1,61	11,2/30,30	0,09/0,260	12,96	11,0
8	30	9	0,86/4,33	11,2/34,55	0,09/0,386	12,01	11,5

Примечание. Здесь и далее, в табл. 2, 3 в числителе приведены начальные данные, в знаменателе – конечные.

С внесением редуцирующих веществ и МЭК из целлюлазных и ксиланазных ферментов в питательную среду из целлолигнина торфа в твердой фазе наблюдается увеличение физиологической активности культуры – рост культуры, что подтверждается увеличением синтеза белков. Эти закономерности взаимосвязаны с продолжительностью культивирования и pH среды. К концу культивирования мицелиального гриба отмечено повышение ферментативной активности культуры. Внеклеточные ксиланазные и целлюлазные ферменты, продуцируемые грибом, гидролизуют целлюлозу, обуславливая по окончании периода культивирования увеличение содержания редуцирующих веществ в культуральной жидкости. Рассматриваемая закономерность подтверждается снижением содержания целлюлозы в целлолигнине.

Культивирование мицелиального гриба *T. reesei* M18 на питательной среде из целлолигнина, обработанного бисульфитом натрия, позволяет значительно увеличить ферментативную активность культуры по сравнению с культивированием на питательной среде, содержащей не обработанный бисульфитом натрия целлолигнин (табл. 2). В рассматриваемом эксперименте повышению физиологической активности культуры способствовало наличие в среде редуцирующих веществ, образующихся при обработке целлолигнина бисульфитом натрия. При продолжительности культивирования 9 сут и pH 8

ксилазная и целлюлазная активность культуры сопоставима с данной ферментативной активностью гриба в случае внесения в питательную среду МЭК и редуцирующих веществ. При увеличении продолжительности культивирования до 15 сут ферментативная активность гриба увеличивается.

Следует отметить, что при первоначальном содержании в питательной среде редуцирующих веществ 0,65 г/л культивирование гриба более эффективно, так как наблюдается повышенная ферментативная активность культуры, сопровождающаяся гидролизом целлюлозы и, соответственно, увеличением содержания редуцирующих веществ к окончанию культивирования. Рост содержания белка в рассматриваемых условиях также подтверждает повышение ферментативной активности мицелиального гриба *T. reesei* M18 при культивировании на питательной среде из целлолигнина торфа, обработанного бисульфитом натрия.

Т а б л и ц а 2

**Влияние pH и продолжительности культивирования
на ферментативную активность штамма мицелиального гриба *T. reesei* M18
на питательной среде из целлолигнина торфа,
обработанного бисульфитом натрия**

pH	Продолжительность культивирования, сут	Редуцирующие вещества, г/л	Активность		Доля негидролизованной целлюлозы, %	Содержание белка, % к биомассе
			ксилазная, IU/мл	целлюлазная, FPU/мл		
8	9	0,65/3,09	63,14	0,612	10,27	19,3
4	9	0,65/2,12	44,34	0,491	13,12	17,6
8	9	1,30/1,96	29,78	0,205	12,08	14,3
4	9	1,30/0,85	15,85	0,144	15,22	9,4
8	15	0,65/4,09	76,54	0,352	9,52	19,8
4	15	0,65/2,10	55,55	0,206	11,86	14,8
8	15	1,30/1,13	24,93	0,348	12,24	14,3
4	15	1,30/1,09	18,83	0,231	16,61	8,5

Внесение в питательную среду целлолигнина торфа, обработанного бисульфитом натрия, и культуральной жидкости, содержащей МЭК 30 об. % от общего объема питательной среды, интенсифицирует синтез грибом *T. reesei* M18 внеклеточных ферментов целлюлазы и ксилазы (табл. 3). Данная закономерность подтверждается повышением содержания этих ферментов при увеличении продолжительности культивирования и pH культивирования 8 и 4. Рост культуры подтверждается снижением содержания в целлолигнине целлюлозы, увеличением содержания белка и редуцирующих веществ в культуральной жидкости на момент окончания культивирования гриба *T. reesei* M18.

Следует отметить, что внесение культуральной жидкости с МЭК в питательную среду из целлолигнина торфа, обработанного сульфитом натрия, приводит к дополнительному повышению ферментативной активности гриба.

Т а б л и ц а 3

Влияние pH, продолжительности культивирования и МЭК на ферментативную активность штамма мицелиального гриба *T. reesei* M18 на питательной среде из целлолигнина торфа, обработанного бисульфитом натрия*

pH	Продолжительность культивирования, сут	Редуцирующие вещества, г/л	Активность		Доля негидролизованной целлюлозы, %	Содержание белка, % к биомассе
			ксилазная, IU/мл	целлюлазная, FPU/мл		
8	9	1,690/4,16	74,02	0,575	8,13	21,5
4	9	1,690/3,65	43,21	0,413	15,25	17,6
8	9	1,235/2,42	15,76	0,268	13,11	17,6
4	9	1,235/2,44	11,57	0,103	17,56	16,1
8	15	1,690/4,80	88,97	0,403	7,21	22,5
4	15	1,690/3,77	62,75	0,231	12,35	20,9
8	15	1,235/1,11	23,51	0,418	16,02	18,4
4	15	1,235/2,06	15,28	0,211	13,24	15,4

*Внесение 30 об. % культуральной жидкости, содержащей МЭК и редуцирующие вещества, от общего количества питательной среды.

Установленные закономерности влияния на ферментативную активность гриба *T. reesei* M18 обработки целлолигнина торфа бисульфитом натрия и внесения в питательную среду МЭК можно объяснить присутствием в этих средах олигомерных углеводов – ксиланов и глюканов, являющихся индукторами синтеза грибом соответствующих ферментов [6, 9].

Биомасса мицелиального гриба *T. reesei* M18, выращенная на целлолигнине торфа, использована для получения адсорбентов микотоксинов, которые успешно испытаны *in vivo* [1].

Выводы

1. Показано, что увеличению ферментативной активности мицелиального гриба *T. reesei* M18 способствует культивирование на питательной среде из целлолигнина, предварительно обработанного бисульфитом натрия, и внесение мультиэнзимных комплексов, содержащих целлюлазы и ксиланазы,

2. Установлено, что культивирование мицелиального гриба *T. reesei* M18 на питательной среде из целлолигнина, обработанного бисульфитом натрия, и внесение мультиэнзимного комплекса, содержащего целлюлазы и ксиланазы, приводит к увеличению синтеза белка и, соответственно, биомассы.

3. Предварительная обработка целлолигнина торфа бисульфитом натрия рекомендуется для биоконверсии мицелиальным грибом *T. reesei* M18 с получением из биомассы адсорбента микотоксинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилов С.В., Канарская З.А. Адсорбционные свойства торфа и продуктов его переработки // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2015. Т. 18, № 2. С. 422–427.
2. Гаврилов С.В., Канарский А.В., Сидоров Ю.Д. Получение хелатных соединений железа с гуминовыми кислотами методом электрохимического синтеза // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2012. Т. 15, № 9. С. 165–168.
3. Грекова А.А., Мальцев А.Н., Дремза И.К. Протективное действие суспензии торфа при микотоксикозах // Сб. науч. тр. Ставропольского НИИ животноводства и кормопроизводства. 2011. № 4–1 (1). С. 136–140.
4. Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2012. Т. 15, № 19 (15). С. 120–122.
5. Немайкалов В.А., Кошелев А.В., Окунев О.Н. Биосинтез карбогидраз гриба *Penicillium verruculosum* при культивировании на различных целлюлозосодержащих субстратах // Тез. 13-й Междунар. Пушинской шк.-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2009. С. 174.
6. Халимова Л.Х., Шараяева А.В., Соколова С.Ю., Петухова Н.И., Зорин В.В. Исследование влияния индукторов на синтез лакказ мицелиальными грибами // Башк. хим. журн. 2010. Т. 17, № 5. С. 46–49.
7. Чухарева Н.В. Исследование группового состава торфов месторождений Томской области // Вестн. Красноярского гос. аграрного ун-та. 2013. № 7. С. 65–71.
8. Burba P., Jakubowski B., Kuckuk R., Kullmer K., Heumann K.G. Characterization of Aquatic Humic Substances and Their Metal Complexes by Immobilized Metal-Chelate Affinity Chromatography on Iron (III) – Loaded Ion Exchangers. *Fresenius' J. of Analytical Chemistry*, 2000, vol. 7(386), pp. 689–696.
9. Camassola M., Dillon A.J.P. Production of Cellulases and Hemicellulases by *Penicillium Echinulatum* Grown on Pretreated Sugar Cane Bagasse and Wheat Bran in Solid-State Fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, no. 103(6), pp. 2196–2204.
10. Islam K.M.S., Schuhmacher A., Gropp J.M. Humic Acid Substances in Animal Agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2005, vol. 4(3), pp. 126–134.
11. Measurement of Cellulase Activities. Ed. by T.K. Ghose. *Pure & Appl. Chem.*, 1987, no. 2, pp. 257–268.
12. Mezes M., Erdélyi M., Balogh K. Deposition of Organic Trace Metal Complexes as Feed Additives in Farm Animals. *Eur. Chem. Bull.*, 2012, vol. 1(10), pp. 410–413.
13. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of Xylanase, β -Glucanase, and Cellulase Activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 374, no. 1, pp. 80–87.
14. Sloneker J.H. Determination of Cellulose and Apparent Hemicellulose in Plant Tissue by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1971, no. 2(43), pp. 539–546.

Поступила 08.06.16

UDC 552.577:676.01: 577.152.3
DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.142

Enzymatic Activity of Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* M18 in Culture in the Nutrient Solution Based on Peat Lignocellulose

*S.V. Gavrilov*¹, *Postgraduate Student*

*A.V. Kanarskiy*¹, *Doctor of Engineering Sciences, Professor*

*E.V. Skvortsov*², *Candidate of Biological Sciences*

*Yu.V. Sevast'yanova*³, *Candidate of Engineering Sciences, Associate Professor*

¹Kazan National Research Technological University, ul. K. Marksa, 72, Kazan, 420015, Russia Federation; e-mail: ser-gavr@mail.ru

²Kazan Federal University, Kremlyovskaya str., 18, Kazan, 420000, Russian Federation; e-mail: eskvortsov@rambler.ru

³Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Naberezhnaya Severnoy Dviny, 17, Arkhangelsk, 163002, Russia Federation; e-mail: j.sevastyanova@narfu.ru

Integrated processing of peat is an important economic issue. The authors have obtained the iron chelates with humic acids by the electrochemical synthesis method. The acids are recommended for use as a feed additive. Due to the formation of the secondary resource – lignocellulose we have encountered a problem of the technology of its processing into the cost-effective products. Lignocellulose contains a large amount of pulp that makes it an attractive material for the biotechnological processing by microorganisms. However, lignocellulose contains lignin, which prevents the enzymatic hydrolysis of cellulose into simple sugars. This fact demands the ways of its pretreatment. Lignocellulose can be used as a nutrient substrate for the cultivation of filamentous fungi of the *Trichoderma* genus, since they are characterized by the expression of xylanase and cellulase activities, which promote the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. The work objective is a definition of the enzyme activity in culture of the strain of filamentous fungus *Trichoderma reesei* M18 in the nutrient solution based on peat lignocellulose. To enhance the enzymatic activity of filamentous fungus we injected a multi-enzymic complex comprising cellulase and xylanase enzymes and reducing agents into the nutrient solution with peat lignocellulose in a solid phase. Lignocellulose was also treated with sodium bisulfite in the experiments; lignin was dissolved and cellulose became more accessible for assimilating by fungus. The expediency of filamentous fungus *Trichoderma reesei* M18 cultivation in the nutrient solution based on peat lignocellulose, pre-treated with sodium bisulfite, is established. The introduction of multi-enzymic complexes, containing cellulase and xylanase, into the nutrient solution based on lignocellulose, treated with sodium bisulfite, improves the enzyme activity of *Trichoderma reesei* M18, which increases the protein and biomass synthesis. The pretreatment of peat lignocellulose by sodium bisulfite is recommended for the

For citation: Gavrilov S.V., Kanarskiy A.V., Skvortsov E.V., Sevast'yanova Yu.V. Enzymatic Activity of Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* M18 in Culture in the Nutrient Solution Based on Peat Lignocellulose. *Lesnoy zhurnal*, 2016, no. 6, pp. 142–152. DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.142

bioconversion by mycelial fungus *Trichoderma reesei* M18 with adsorbent of mycotoxins obtaining from biomass. The biomass of filamentous fungi *Trichoderma reesei* M18, grown on peat lignocellulose, is used to produce the adsorbents of mycotoxins, which successfully have been tested in vivo.

Keywords: peat, lignocellulose, sodium bisulfite treatment, xylanase, cellulase, *Trichoderma reesei* M18 cultivation.

REFERENCES

1. Gavrilov S.V., Kanarskaya Z.A. Adsorbtsionnye svoystva torfa i produktov ego pererabotki [The Adsorption Properties of Peat and Its Derivative Products]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2015, vol. 18, no. 2, pp. 422–427.
2. Gavrilov S.V., Kanarskiy A.V., Sidorov Yu.D. Poluchenie khelatnykh soedineniy zheleza s guminovymi kislotami metodom elektrokhimicheskogo sinteza [Preparation of Iron Chelating with Humic Acids by Electrochemical Synthesis]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, no. 9(15), pp. 165–168.
3. Grekova A.A., Mal'tsev A.N., Dremza I.K. Protektivnoe deystvie suspensii torfa pri mikotoksikozakh [The Protective Effect of Peat Suspension on Mycotoxicoses]. *Sb. nauch. tr. Stavropol'skogo NII zhivotnovodstva i kormoproizvodstva* [Proc. Stavropol Research Institute of Livestock and Fodder Production], 2011, no. 4–1(1), pp. 136–140.
4. Morozova Yu.A., Skvortsov E.V., Alimova F.K., Kanarskiy A.V. Biosintez ksylanaz i tsellyulaz gribami roda *Trichoderma* na poslespirtovoy barde [The Biosynthesis of Xylanase and Cellulase by Fungi of *Trichoderma* Genus on DDGS]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, vol. 15, no. 19, pp. 120–122.
5. Nemashkalov V.A., Koshelev A.V., Okunev O.N. Biosintez karbogidraz griba *Penicillium verruculosum* pri kul'tivirovanii na razlichnykh tsellyulozoderzhashchikh substratakh [Carbohydrases Biosynthesis of *Penicillium verruculosum* Fungus when Cultured on Different Cellulosic Substrates]. *Tez. 13-y Mezhdunar. Pushchinskoy shk.-konf. molodykh uchenykh "Biologiya – nauka XX veka"* [Proc. 13th Intern. Pushchino School-Conf. of Young Scientists "Biology is the Science of the 20th Century"]. Pushchino, 2009, p. 174.
6. Khalimova L.Kh., Sharaeva A.V., Sokolova S.Yu., Petukhova N.I., Zorin V.V. Issledovanie vliyaniya induktorov na sintez lakkaz mitselial'nymi gribami [The Effect of Inductors on the Synthesis of Laccases by Filamentous Fungi]. *Bashkirskiy khimicheskiy zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2010, no. 5(17), pp. 46–49.
7. Chukhareva N.V. Issledovanie gruppovogo sostava torfov mestorozhdeniy Tomskoy oblasti [The Study of the Peat Group Composition of Deposits of Tomsk Region]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [The Bulletin of KrasGAU], 2013, no. 7, pp. 65–71.
8. Burba P., Jakubowski B., Kuckuk R., Kullmer K., Heumann K.G. Characterization of Aquatic Humic Substances and Their Metal Complexes by Immobilized Metal-Chelate Affinity Chromatography on Iron (III) – Loaded Ion Exchangers. *Fresenius' J. of Analytical Chemistry*, 2000, vol. 7(386), pp. 689–696.
9. Camassola M., Dillon A.J.P. Production of Cellulases and Hemicellulases by *Penicillium Echinulatum* Grown on Pretreated Sugar Cane Bagasse and Wheat Bran in Solid-State Fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, no. 103(6), pp. 2196–2204.
10. Islam K.M.S., Schuhmacher A., Gropp J.M. Humic Acid Substances in Animal Agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2005, vol. 4(3), pp. 126–134.

11. Measurement of Cellulase Activities. Ed. by T.K. Ghose. *Pure & Appl. Chem.*, 1987, no. 2, pp. 257–268.
12. Mezes M., Erdélyi M., Balogh K. Deposition of Organic Trace Metal Complexes as Feed Additives in Farm Animals. *Eur. Chem. Bull.*, 2012, vol. 1(10), pp. 410–413.
13. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of Xylanase, β -Glucanase, and Cellulase Activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 374, no. 1, pp. 80–87.
14. Sloneker J.H. Determination of Cellulose and Apparent Hemicellulose in Plant Tissue by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1971, no. 2(43), pp. 539–546.

Received on June 08, 2016