

УДК 577.15:579.8

DOI 10.19110/1994-5655-2021-5-72-77

**А.А. ШУБАКОВ, В.В. ВОЛОДИН,
С.О. ВОЛОДИНА, В.В. МАРТЫНОВ**

**СТУПЕНЧАТЫЙ ОТБОР
ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ
ПО ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛОНИЙ
ГРИБА *TRICHODERMA VIRIDE***

*Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
г. Сыктывкар*

*shubakov.anatol@mail.ru,
vladimir131035@yandex.ru,
svetlana20664@yandex.ru,
mar7inov.v@yandex.ru*

**A.A. SHUBAKOV, V.V. VOLODIN,
S.O. VOLODINA, V.V. MARTYNOV**

**STEP-BY-STEP SELECTION OF HIGHLY
PRODUCTIVE BY CELLULASE ACTIVITY
COLONIES OF FUNGUS *TRICHODERMA
VIRIDE***

*Institute of Biology, Federal Research Centre
Komi Science Centre, Ural Branch, RAS,
Syktывkar*

Аннотация

В работе представлены результаты проведенного ступенчатого отбора высокопродуктивных по целлюлазной активности колоний гриба *Trichoderma viride* ВКПМ 13/10 (F-120). Для получения и отбора колоний *T. viride* 13/10 использовали плотные питательные среды, в которых источниками углерода являлись растворимые субстраты (2 % сахара, 2 % натрий-карбоксиметилцеллюлоза) и нерастворимые, трудногидролизуемые субстраты (фильтровальная бумага Ватман № 1 и целлюлоза производства «Монди Сыктывкарский ЛПК»). Целлюлазную активность колоний *T. viride* 13/10 оценивали по осахариванию фильтровальной бумаги. В результате проведенной по разработанной нами схеме селекции штамма *T. viride* 13/10 удалось увеличить целлюлазную активность штамма по сравнению с его исходной активностью в 6,2–7,0 раза. Дальнейшая селекция, особенно с использованием мутагенных факторов, может еще более повысить уровень синтеза целлюлаз культурой гриба *T. viride*.

Ключевые слова:

грибы, Trichoderma viride, целлюлазы, селекция

Abstract

The paper presents the results of the stepwise selection of highly productive by cellulase activity colonies of the fungus *Trichoderma viride* ARCIM 13/10 (F-120). To obtain and select *T. viride* 13/10 colonies, dense nutrient media were used, in which the carbon sources were soluble substrates (2 % sucrose, 2 % sodium carboxymethyl cellulose) and insoluble, hardly hydrolyzable substrates (Whatman No. 1 filter paper and cellulose produced by JSC «Mondi Syktывkar Timber Industry Complex»). Cellulase activity of *T. viride* 13/10 colonies was assessed by saccharification of filter paper. As a result of the selection of the *T. viride* 13/10 strain carried out according to the scheme developed by us, it was possible to increase the cellulase activity of the strain in comparison with its initial activity by 6,2–7,0 times. Further selection, especially with the use of mutagenic factors, can further increase the level of cellulase synthesis by the culture of the fungus *T. viride*.

Keywords:

fungi, Trichoderma viride, cellulases, selection

Введение

Ферментативный гидролиз целлюлозы происходит в результате последовательно-параллельного действия нескольких ферментов, входящих в

состав так называемого целлюлазного комплекса [1–4]. Целлюлазы, катализирующие гидролиз β -1,4-гликозидных связей целлюлозы, принадлежат к группе гликозидгидролаз и состоят из трех основных типов ферментов: эндоглюканазы (КФ 3.2.1.4), целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91) и β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21). Эндоглюканазы неупорядоченно гидролизуют в целлюлозе β -1-4-гликозидные связи с образованием целлоолигосахаридов. Целлобиогидролазы отщепляют целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов, а β -глюкозидазы, или целлобиазы, гидролизуют целлобиозу, высвобождая две молекулы глюкозы [1, 5, 6].

Наиболее известными и используемыми в промышленности продуцентами целлюлаз являются грибы рода *Trichoderma* (*T. reesei*, *T. viride*). Они конвертируют целлюлозную биомассу до глюкозы, которая может быть использована для различных целей, таких как производство биоэтанола, в кормах для животных, в очистке сточных вод и пивоваренной промышленности [7, 8].

Одной из проблем промышленной биотехнологии является то, что многие штаммы-продуценты ферментов, в том числе и целлюлаз, в процессе периодических пересевов снижают свою активность. Это уменьшает выход целевого продукта и отрицательно сказывается на экономике производства. Решением данной проблемы является селекция высокопродуктивных штаммов-продуцентов ферментов [9].

То есть, наряду с поиском новых микроорганизмов с высоким уровнем биосинтеза внеклеточных ферментов, значительное развитие получили исследования по селекции более активных мутантов как новых, так и отобранных ранее [10].

Начало интенсивной селекции штаммов-продуцентов гидролитических ферментов было положено в 70-х г. XX в. работами Мандельс с сотрудниками, сообщившими о получении двух мутантов гриба *Trichoderma reesei*, обладавших высокой целлюлазной активностью. Авторы использовали традиционный селекционный прием обработки штамма дикого типа мутагенными факторами в сочетании со ступенчатым отбором. В результате общую активность внеклеточных целлюлаз, образуемых этой культурой, удалось повысить сначала в два, а затем еще в 1,4 раза [11, 12].

Для получения высоких уровней активности внеклеточных ферментов целлюлаз проводят оптимизацию параметров ферментации микроорганизмов – продуцентов ферментов, включая состав питательной среды для культивирования, оптимальные время культивирования, pH среды и температура культивирования [13]. Для повышения выхода целлюлаз, их активности и стабильности используют различные методы селекции и мутагенеза [14, 15].

Цель работы – отбор высокопродуктивных по целлюлазной активности колоний штамма *Trichoderma viride* ВКПМ F-13/10 на основе трудногидролизуемых целлюлозных материалов – фильтровальная бумага и целлюлоза производства «Монди Сыктывкарский ЛПК».

Материалы и методы

Объект исследования – продуцент целлюлолитических ферментов штамм мицелиального гриба *Trichoderma viride* ВКПМ 13/10 (F-120). Культуру поддерживали на агаризованной среде Ролена-Тома (РТ) при температуре +4 °С.

В качестве посевного материала использовали споровые суспензии *T. viride* 13/10 в стерильной дистиллированной воде. Засев производили в расчете 0,5 мл споровой суспензии на 100 мл жидкой питательной среды. За основу была принята питательная среда Ролена-Тома (РТ) следующего состава (%): $C_4H_4O_6(NH_4)_2$ – 0,33; KH_2PO_4 – 0,2; K_2SO_4 – 0,02; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,02; кукурузный экстракт – 1,0; раствор микроэлементов – 0,1 мл на 100 мл среды. Раствор микроэлементов имел следующий состав (%): $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,008; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,04; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,08; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ – 0,01; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – 0,03; H_3BO_3 – 0,006; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,1.

Другой питательной средой для культивирования *T. viride* 13/10 служила разработанная нами среда, обозначенная как среда № 1, следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KH_2PO_4 – 2,0; раствор микроэлементов – 0,1 мл на 100 мл среды. Раствор микроэлементов имел состав, аналогичный таковому для среды РТ.

Легкомоетаболизируемыми источниками углерода в среде для культивирования *T. viride* являлись сахароза (2 %) или Na-карбоксиметилцеллюлоза (Na-KМЦ, 2 %). Трудногидролизуемыми лигноцеллюлозными материалами служили фильтровальная бумага Ватман № 1 и целлюлоза производства «Монди Сыктывкарский ЛПК».

При получении плотной агаризованной среды к жидкой среде добавляли 3 % агара.

Культуру гриба выращивали в колбах при перемешивании (220 об/мин) с объемом питательной среды 100 мл при 24 °С. Исходное значение pH среды было 5,0 без дальнейшего регулирования в процессе культивирования.

Общую целлюлазную активность по осаживанию фильтровальной бумаги (АФБ) определяли по методу Родионовой с соавт. [16]. Полоски фильтровальной бумаги размером 1 см×6 см помещали в две стеклянные пробирки, в которые добавляли 1 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера (pH 5,0) и 1 мл соответствующе разбавленного ферментного раствора. Пробирки инкубировали в водяном термостате при 50 °С в течение 1 ч., после чего из каждой пробирки отбирали по 1 мл раствора и определяли в них редуцирующие сахара по методу Нельсона-Шомоди [17, 18]. За одну единицу АФБ принимали такое количество фермента, которое освобождало при данных условиях из фильтровальной бумаги 1 мкмоль эквивалентов глюкозы за 1 ч.

Вес сухой биомассы определяли центрифугированием грибных культур в пробирках Эппендорфа, после чего пробирки высушивали до постоянного веса при 60 °С.

Цифровые данные в статье представляют собой средние величины, полученные в результате

трех независимо проведенных друг от друга экспериментов.

Результаты и обсуждение

Метод одно- и многоступенчатого отбора, применяемый в научных исследованиях при селекции высокоактивных продуцентов ферментов, довольно трудоемок и для получения штаммов со значительным увеличением активности ферментов требуется продолжительное время. Поэтому для ограничения числа вариантов, проверяемых в ходе отбора, создают селективные условия для первичной оценки мутантов по признаку, легче тестируемому, чем продуктивность культуры в отношении биосинтеза ферментов. В этом случае отбор мутантов проводят на агаризованных средах с труднометаболизируемым субстратом, основываясь на признаке размера колоний. У более крупных колоний затем проверяют активность ферментов [11, 19]. Поэтому в нашей работе в процессе ступенчатого отбора высокоактивных по целлюлазной активности колоний гриба *Trichoderma viride* в качестве труднометаболизируемых субстратов мы использовали фильтровальную бумагу Ватман № 1 и целлюлозу, произведенную на «Монди Сыктывкарский ЛПК».

Определение исходной целлюлазной активности гриба *Trichoderma viride* ВКПМ 13/10 (F-120). Исходная культура *T. viride* 13/10 в течение более чем 20 лет хранилась в пробирках на скошенной агаризованной среде Ролена-Тома РТ с 2 % сахарозы при температуре +4 °С при регулярных пересевах на свежие питательные среды один раз в два–три месяца. В пробирку с культурой *T. viride*

13/10 добавляли 5 мл стерильной дистиллированной воды с целью получения суспензии спор. Из пробирки со споровой суспензией *T. viride* были засеяны колбы со 100 мл жидкой питательной среды РТ, содержащей в качестве источника углерода 2 % сахарозы. Засев производили из расчета 0,5 мл споровой суспензии на 100 мл среды. Культивирование проводилось на качалке (220 об/мин) при температуре 24 °С. Через 4 и 5 суток были определены вес сухой биомассы и в фильтратах культуральной жидкости – общая целлюлазная активность по осахариванию фильтровальной бумаги – АФБ (табл. 1).

Как видно из табл. 1, исходная целлюлазная активность культуры гриба *T. viride* составляла 0,8–0,9 ед/мл АФБ, а удельная АФБ – 0,3 ед/мг с.б.

Культивирование *T. viride* 13/10 на плотной агаризованной среде. На 1-м этапе ступенчатого отбора культуру гриба *T. viride* рассевали в чашки Петри на поверхности плотной агаризованной среды РТ, содержащей в качестве источника углерода 2 % сахарозы, с целью получения изолированных колоний. Исходная споровая суспензия гриба была разведена в 10⁶ раз. Затем отбирали по 0,1 мл разведенной споровой суспензии и растирали ее стерильным шпателем Дригальского в чашках Петри по поверхности плотной среды. Выращивание колоний проводили в термостате при 28 °С. Каждая отдельная спора *T. viride* давала отдельную, изолированную колонию и через семь суток культивирования отбирали колонии визуально по морфологическим признакам (диаметр колонии) с наилучшими, и в качестве контроля – со средними и наихудшими показателями роста. Отобранные колонии были обозначены следующим образом: 1–1, 1–2 – колонии с наилучшими показателями роста; 2–1, 2–2 – со средними показателями; 3–1, 3–2 – колонии с наихудшими показателями роста.

Отобранные колонии *T. viride* культивировали в жидкой питательной среде РТ с 2 % сахарозы. Предварительно из центра каждой колонии гриба микробиологической иглой были вырезаны диски с культурой, которые были перенесены в соответствующую колбу с жидкой средой РТ. После двух суток культивирования определяли вес сухой биомассы и общую целлюлазную активность (табл. 2).

Как видно из табл. 2, колонии с наилучшими морфологическими показателями роста синтезировали больше всего целлюлаз. АФБ их составляет 1,3–1,4 ед/мл, а удельная АФБ – 0,11 ед/мг сухой биомассы (с.б.). Несколько ниже целлюлазная активность была в фильтратах после культивирования колоний со средними показателями роста: 0,5–0,8 ед/мл АФБ и удельная АФБ – 0,04–0,07 ед/мг с.б. Колонии с наихудшими морфологическими показателями роста обладали довольно низкой целлюлазной активностью на порядок ниже по сравнению с колониями с наилучшими морфологическими показателями роста: 0,1–0,2 ед/мл АФБ, удельная АФБ – 0,01–0,02 ед/мг с.б.

Таким образом, АФБ колоний с наилучшими морфологическими показателями роста увеличилась от исходной 0,7–0,8 до 1,3–1,4 ед/мл.

Таблица 1

Исходная общая целлюлазная активность по осахариванию фильтровальной бумаги (АФБ) штамма *Trichoderma viride* 13/10

Table 1

Initial total cellulase activity for saccharification of filter paper (FPA) of strain *Trichoderma viride* 13/10

Время, сутки	Вес сухой биомассы, г/л	АФБ, ед/мл	Удельная АФБ, ед/мг с.б.
4	2,7	0,8	0,3
5	3,0	0,9	0,3

Таблица 2

АФБ отобранных по морфологическим показателям роста колоний *Trichoderma viride* 13/10 через двое суток культивирования в жидкой среде РТ с 2 % сахарозы

Table 2

FPA of *Trichoderma viride* 13/10 colonies selected according to morphological growth parameters after 2 days of cultivation in a liquid RT medium with 2 % sucrose

Колония	Вес сухой биомассы, г/л	АФБ, ед/мл	Удельная АФБ, ед/мг с.б.
1–1	12,9	1,4	0,11
1–2	11,6	1,3	0,11
2–1	11,9	0,8	0,07
2–2	12,8	0,5	0,04
3–1	11,4	0,1	0,01
3–2	11,3	0,2	0,02

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что у штамма *T. viride* 13/10 обнаруживается взаимосвязь между интенсивностью роста культуры и синтезом целлюлолитических ферментов. Чем более активный рост культуры на плотной среде, тем более интенсивно происходит синтез целлюлаз.

Культивирование *T. viride* 13/10 на плотной агаризованной среде с трудногидролизуемым лигноцеллюлозным материалом. На втором этапе селекции культуры *T. viride* 13/10, отобранные по морфологическим показателям роста, переседали из колб в чашки Петри с агаризованной средой РТ, содержащей в качестве источника углерода трудногидролизуемый субстрат – фильтровальную бумагу Ватман № 1 (ФБ) или целлюлозу (Ц) производства «Монди Сыктывкарский ЛПК». В плотной среде вырезали лунки, в которые заседали культуры *T. viride* (1–1, 1–2, 2–1, 2–2, 3–1, 3–2): по 0,2 мл культуры из колб в каждую лунку. После этого чашки Петри помещали в термостат для выращивания при 28 °С в течение 10 суток.

Далее выросшие в лунках колонии переседали в колбы с жидкой питательной средой РТ, содержащей в качестве источника углерода 2 % сахарозы. Через пять суток культивирования *T. viride* на качалке были определены вес сухой биомассы и в фильтратах – общая целлюлазная активность (табл. 3).

Как видно из табл. 3, после выращивания *T. viride* на плотной среде с трудногидролизуемым субстратом и дальнейшего культивирования колоний на жидкой среде РТ с 2 % сахарозы общая целлюлазная активность несколько увеличилась как в случае фильтровальной бумаги, так и в случае целлюлозы. АФБ колоний, отобранных по наилучшим морфологическим показателям роста, увеличилась до 2,0–2,5 ед/мл, что выше по сравнению с исходной активностью в 2,9–3,1 раза. АФБ других колоний повысилась незначительно.

Для дальнейшей селекции была отобрана колония 1–2 *T. viride* 13/10, секретирующая в жидкой среде достаточно большое количество целлюлаз (АФБ 2,4 ед/мл).

Колонию 1–2 переседали из колбы в чашки Петри с агаризованной средой № 1, содержащей в качестве источника углерода фильтровальную бумагу. В плотной среде вырезали лунки, в которые вносили по 0,2 мл жидкой культуры колонии 1–2 *T. viride* 13/10. Чашки помещали в термостат при 28 °С для выращивания колоний в течение 10 суток.

После этого визуально по морфологическим показателям роста и степени деструкции фильтровальной бумаги были отобраны пять колоний *T. viride*: Т–1, Т–2, Т–3, Т–4, Т–5.

Далее отобранные колонии *T. viride* переседали в колбы с жидкой питательной средой № 1, содержащей в качестве источника углерода 2 % Na-КМЦ. Через пять суток культивирования

при 28 °С были определены вес сухой биомассы и в фильтратах – общая целлюлазная активность (табл. 4).

Как видно из табл. 4, общая целлюлазная активность по сравнению с колонией 2–1 не увеличилась для колоний Т–2 (АФБ 2,4 ед/мл), но у остальных четырех колоний активность возросла до 2,5–3,3 ед/мл.

На основании наибольшей целлюлазной активности (АФБ – 3,3 ед/мл, удельная АФБ – 0,73 ед/мг с.б.) для дальнейшей селекции была использована колония Т–3 *T. viride* 13/10.

В последующих пяти проведенных циклах селекции колония Т–3 *T. viride* 13/10 переседалась на плотную среду № 1 с фильтровальной бумагой. На основании степени гидролиза фильтровальной бумаги отбиралась

Таблица 3
АФБ выросших на плотной среде РТ с трудногидролизуемым субстратом колоний *Trichoderma viride* 13/10 через пять суток культивирования в жидкой среде РТ с 2 % сахарозы

Table 3

FPA of colonies of *Trichoderma viride* 13/10 grown on a dense RT medium with a hardly hydrolysable substrate after 5 days of cultivation in a liquid RT medium with 2% sucrose

Колония	Субстрат	Вес сухой биомассы, г/л	АФБ, ед/мл	Удельная АФБ, ед/мг с.б.
1–1	ФБ	6,2	2,0	0,32
1–2	ФБ	9,4	2,4	0,26
2–1	ФБ	7,0	0,7	0,10
2–2	ФБ	9,3	0,7	0,08
3–1	ФБ	7,1	0,1	0,01
3–2	ФБ	7,1	0,3	0,04
1–1	Ц	6,1	2,2	0,36
1–2	Ц	8,7	2,5	0,29
2–1	Ц	7,7	0,8	0,10
2–2	Ц	7,9	0,9	0,11
3–1	Ц	7,6	0,2	0,03
3–2	Ц	6,9	0,4	0,06

Таблица 4
АФБ выросших на плотной среде № 1 с фильтровальной бумагой колоний *Trichoderma viride* 13/10 через пять суток культивирования в жидкой среде № 1 с 2 % Na-КМЦ

Table 4

FPA of colonies of *Trichoderma viride* 13/10 grown on a dense medium No. 1 with filter paper after 5 days of cultivation in a liquid medium No. 1 with 2 % Na-CMC

Колония	Вес сухой биомассы, г/л	АФБ, ед/мл	Удельная АФБ, ед/мг с.б.
Т–1	4,2	2,8	0,67
Т–2	3,8	2,4	0,63
Т–3	4,5	3,3	0,73
Т–4	4,0	2,6	0,65
Т–5	4,1	2,5	0,61

наиболее активные колонии, АФБ которых проверялась при культивировании в колбах на жидкой среде № 1 с 2 % Na-КМЦ.

В результате проведенных экспериментов была отобрана колония Т-36, обладающая наибольшей целлюлазной активностью (АФБ – 5,6 ед/мл, удельная АФБ – 1,4 ед/мг с.б.) по сравнению со всеми другими испытанными колониями *T. viride* 13/10.

Культура *T. viride* с наибольшей целлюлазной активностью была пересеяна в пробирки со скошенной агаризованной средой РТ для хранения при температуре +4 °С. Полученная колония *T. viride* с высокой целлюлазной активностью в лиофилизированном состоянии может храниться долгое время без снижения своей продуктивности.

Заключение

На основании проведенных исследований можно заключить, что в результате ступенчатого отбора высокопродуктивных по целлюлазной активности колоний гриба *Trichoderma viride* отобрана колония с высокой целлюлазной активностью. При этом, общая целлюлазная активность отобранной колонии штамма *T. viride* ВКПМ F-13/10 по сравнению с исходной активностью была увеличена в 6,2–7,0 раза. Дальнейшая селекция, особенно с использованием мутагенных факторов, может еще больше повысить уровень синтеза целлюлаз культурой гриба *T. viride*.

Исследования проведены в рамках темы НИР ГР №АААА-А17-117121270025-1.

Литература

1. Клесов А.А., Григораш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы III. Закономерности образования глюкозы и целлобиозы при действии полиферментных целлюлазных систем на нерастворимую (природную) целлюлозу // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1538–1552.
2. Fungal cellulases / C.M. Payne, B.C. Knott, H.B. Mayes, H. Hansson, M.E. Himmel, M. Sandgren, J. Stahlberg, G.T. Beckham // Chem. Rev. 2015. Vol. 115. P. 1308–1448.
3. Roth J.C.G., Michele Hoeltz M., Benitez L.B. Current approaches and trends in the production of microbial cellulases using residual lignocellulosic biomass: a bibliometric analysis of the last 10 years // Arch. Microbiol. 2020. Vol. 202. P. 935–951.
4. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications / A. Singh, S. Bajar, A. Devi, D. Pant // Bioresour. Technol. Rep. 2021. Vol. 14. Article 100652.
5. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002. Vol. 66. № 3. P. 506–577.
6. Kumar A., Gautam A., Dutt D. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: An Overview // Adv. Biosci. Biotechnol. 2016. Vol. 7. P. 149–168.
7. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective / S. Sajth, P. Priji, S. Sreedevi, S. Behjamin // J. Nutr. Food Sci. 2016. Vol. 6. № 1. P. 1–13.
8. Microbial cellulases: A review on strain development, purification, characterization and their industrial applications / H. Sher, N. Zeb, S. Zeb, A. Ali, B. Aleem, F. Iftikhar, S.U. Rahman, M.H. Rashid // J. Bacteriol. Mycol. 2021. Vol. 8. № 5. P. 1–15.
9. Zhang Y.-H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies // Biotechnol. Adv. 2006. Vol. 24. № 5. P. 452–481.
10. Селекция мутантного штамма *Aspergillus alliaceus* – продуцента пектингидролаз / P.B. Михайлова, А.Г. Лобанок, Л.И. Сапунова, Ж.Ф. Шишко, И.Е. Зенкович // Прикл. биохим. микробиол. 1998. Т. 34. № 1. С. 83–86.
11. Клесов А.А. Целлюлолитические микроорганизмы и ферменты // Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. 1988. Т. 10. 224 с.
12. Клесов А.А., Виноградова Л.Г. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы // Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. 1988. Т. 12. 154 с.
13. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet / X.-H. Li, H.-J. Yang, B. Roy, E.Y. Park, L.-J. Jiang, D. Wang, Y.-G. Miao // Microbiol. Res. 2010. Vol. 165. P. 190–198.
14. Mandels M., Weber J., Parizek R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride* // Appl. Microbiol. 1971. Vol. 21. P. 152–154.
15. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* с повышенным образованием целлюлаз и ксиланаз / И.В. Соловьева, О.Н. Окунев, В.В. Вельков, А.В. Кошелев, Т.В. Бубнова, Е.Г. Кондратьева, А.А. Скомаровский, А.П. Синицын // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 172–178.
16. Родионова Н.А., Тунова Н.А., Фениксова Р.В. Методы определения целлюлазной активности // Прикл. биохим. микробиол. 1966. Т. 2. Вып. 2. С. 197–205.
17. Nelson N. A photometric adaptation of the determination of reducing sugars // J. Biol. Chem. 1944. Vol. 153. P. 375–380.
18. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars // J. Biol. Chem. 1945. Vol. 160. P. 61–68.
19. A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities / K. Neethu, M. Rubeena, S. Sajith, S. Sreedevi, P. Priji, K.N. Unni, M.K.S. Josh, V.N. Jisha, S. Pradeep, S. Benjamin // Adv. Biosci. Biotechnol. 2012. Vol. 3. No. 8. P. 1160–1166.

References

1. Klesov A.A., Grigorash S.Yu. Fermentativnyj gidroliz celljulozy III. Zakonomernosti obrazovaniya gljukozy i cellobiozy pri dejstvii polifermentnyh celljulaznyh sistem na nerastvorimuju (prirodnuju) celljulozu [Enzymatic hydrolysis of cellulose III. Regularities of the formation of glucose and cellobiose under the action of

- polyenzyme cellulase systems on insoluble (natural) cellulose] // Bioorg. chemistry. 1981. Vol. 7. № 10. P. 1538–1552.
2. Fungal cellulases / C.M. Payne, B.C. Knott, H.B. Mayes, H. Hansson, M.E. Himmel, M. Sandgren, J. Stahlberg, G.T. Beckham // Chem. Rev. 2015. Vol. 115. P. 1308–1448.
 3. Roth J.C.G. Michele Hoeltz M., Benitez L.B. Current approaches and trends in the production of microbial cellulases using residual lignocellulosic biomass: a bibliometric analysis of the last 10 years // Arch. Microbiol. 2020. Vol. 202. P. 935–951.
 4. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications / A. Singh, S. Bajar, A. Devi, D. Pant // Bioresour. Technol. Rep. 2021. Vol. 14. Article 100652.
 5. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002. Vol. 66. № 3. P. 506–577.
 6. Kumar A., Gautam A., Dutt D. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: An Overview // Adv. Biosci. Biotechnol. 2016. Vol. 7. P. 149–168.
 7. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective / S. Sajith, P. Priji, S. Sreedevi, S. Behjamin // J. Nutr. Food Sci. 2016. Vol. 6. № 1. P. 1–13.
 8. Microbial cellulases: A review on strain development, purification, characterization and their industrial applications / H.Sher, N.Zeb, S.Zeb, A. Ali, B. Aleem, F. Iftikhar, S.U. Rahman, M.H. Rashid // J. Bacteriol. Mycol. 2021. Vol. 8. № 5. P. 1–15.
 9. Zhang Y.-H.P., Himmel M.E, Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies // Biotechnol. Adv. 2006. Vol. 24. № 5. P. 452–481.
 10. Selekcija mutantnogo shtamma *Aspergillus alliaceus* – producenta pektinidrolaz [Selection of a mutant strain of *Aspergillus alliaceus* – a producer of pectin hydrolases] / R.V. Mikhailova, A.G. Lobanok, L.I. Sapunova, Zh.F. Shishko, I.E. Zenkovich // Prikl. biohim. mikrobiol. [Appl. Biochem. Microbiol.]. 1998. Vol. 34. № 1. P. 83–86.
 11. Klesov A.A. Celljuloliticheskie mikroorganizmy i fermenty [Cellulolytic microorganisms and enzymes] // Itogi nauki i tehniki, serija Biotehnologija [Results of Science and Technology, Biotechnology series] 1988. Vol. 10. 224 p.
 12. Klesov A.A., Vinogradova L.G. Biotehnologija fermentativnogo prevrashhenija celljulozy [Biotechnology of enzymatic transformation of cellulose] // Itogi nauki i tehniki, serija Biotehnologija [Results of science and technology, Biotechnology series]. 1988. Vol. 12. 154 p.
 13. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwawe and ultraviolet / X.-H Li., H.-J.Yang, B.Roy, E.Y. Park, L.-J. Jiang, D. Wang, Y.-G. Miao // Microbiol. Res. 2010. Vol. 165. P. 190–198.
 14. Mandels M., Weber J., Parizek R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride* // Appl. Microbiol. 1971. Vol. 21. P. 152–154.
 15. Poluchenie i svojstva mutantov *Penicillium verruculosum* s povyshennym obrazovaniem celljulaz i ksilanaz [The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases] / I.V. Solovyeva, O.N. Okunev, V.V. Vel'kov, A.V. Koshelev, T.V. Bubnova, E.G. Kondratyeva, A.A. Skomarovsky, A.P. Sinityn // Mikrobiologija. [Microbiology] 2005. Vol. 74. № 2. P. 172–178.
 16. Rodionova N.A., Tiunova N.A., Feniksova R.V. Metody opredelenija celljulaznoj aktivnosti [Methods for determining cellulase activity] // Prikl. biohim. mikrobiol. [Appl. Biochem. Microbiol.]. 1966. Vol. 2. Issue 2. P. 197–205.
 17. Nelson N. A photometric adaptation of the determination of reducing sugars // J. Biol. Chem. 1944. Vol. 153. P. 375–380.
 18. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars // J. Biol. Chem. 1945. Vol. 160. P. 61–68.
 19. A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities / K. Neethu, M. Rubeena, S. Sajith, S.Sreedevi, P. Priji, K.N. Unni, M.K.S. Josh, V.N. Jisha, S. Pradeep, S. Benjamin // Adv. Biosci. Biotechnol. 2012. Vol. 3. No. 8. P. 1160–1166.

Статья поступила в редакцию 26.10.2021.