

24+К-3; П-1+ <i>Candida sp.</i>	$4,1 \times 10^7$	17±0,06
24+ <i>Candida sp.</i> ; К-3+ П-1	$2,4 \times 10^7$	12±0,07
24+ П-1; К-3; <i>Candida sp.</i>	$4,6 \times 10^8$	31±0,30
24+К-3 + <i>Candida sp.</i> ; П-1	$3,9 \times 10^7$	9±0,02
24+ <i>Candida sp.</i> +П-1; К-3	$2,8 \times 10^7$	30±0,40
<i>Candida sp.</i> + П-1+ К-3; 24	$3,0 \times 10^7$	30±0,60
Раздельное культивирование	$1,8 \times 10^8$	30±0,50

А5 ассоциациясы нұсқалары ішінде микроорганизмдер клеткаларын жинақтауы жағынан ең тәуірі, культуралары жеке культивирлеп, соңынан тендей қатынаста ( $2,0 \times 10^8$ ) қосып араластырылған 8-нұсқа мен *Arthrobacter* 24 *Arthrobacter* П-1-мен бірге және *Arthrobacter* К3-ды *Candida sp.*-мен өсіріліп, соңынан тендей қатынаста ( $4,6 \times 10^8$ ) араластырылған 3-нұсқа болатыны анықталды.

Культураларын жеке-жеке өсіріп бірдей қатынаста араластырып дайындалған ассоциация, барлық 4 штамы бірге өсірілген ассоциацияға қарағанда мұнайототықтыру белсенділігі жағынан 30 %-ға артық болды. *Arthrobacter* 24, *Arthrobacter* П-1 және *Candida sp.* культуралары бірге, ал *Arthrobacter* К3 жеке өсірілген 6-нұсқада, және де *Arthrobacter* К3, *Arthrobacter* П-1 және *Candida sp.* бірге, ал *Arthrobacter* 24 жеке өсіріп, соңынан 3:1 қатынаста араластырылған 7-нұсқада да дәл осындай нәтиже алынды.

А6 ассоциациясының құрамына кіретін культураларды жеке-жеке өсірілгенде, оның мұнайототықтыру – 26%, ал 24 және П-1 культураларын бірге, К-3 культурасын жеке өсіріліп, соңынан араластырылған нұсқада – 27 % болды.

Сонымен, зерттеу барысында А4, А5 және А6 ассоциацияларының құрамына кіретін микроорганизмдерді культивирлеу жағдайлары және оларды бірге культивирлеу үшін ең қолайлы қатынастыры іріктелініп алынды.

1. Звягинцев Д.Г., Умаров М.М., Чернов Ю.И. и др. Микробиологические сообщества и их функционирование в процессах деградации и самовосстановления почв / Деградация и охрана почв/ Под ред. Г.В.Добровольского. М.Изд-во МГУ, 2002. С.441-445.

2. Гаврилова Н.Н., Айткельдиева С.А., Ратникова И.А., Треножникова Л.П., Баякишева К., Хасенова А.Х. Подбор условий культивирования нефтеокисляющих бактерий // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. - №3. – С. 15-18.

\*\*\*

Подобраны условия культивирования микроорганизмов, входящих в состав ассоциаций А4, А5 и А6 и оптимальные их соотношения для совместного культивирования.

\*\*\*\*

The conditions for cultivation of microorganisms belonging to the association, А4, А5 and А6 and their relationship to the optimal co-cultivation.

**Р.К. Блиева**

## **ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ И СЕЛЕКЦИЯ МИКРОМИЦЕТОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ**

(РГП «Микробиология және вирусология институты» КН МОН РК)

*В статье представлены результаты многолетних исследований о путях увеличения биосинтеза жизненно необходимых для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства энзимов. Показана необходимость изучения физиологической регуляции направленного биосинтеза ферментов, разработан новый более продуктивный и экономичный способ выращивания микромицетов на подложке в нитчато-губчатый структуре. Разработан перспективный способ селекции микромицетов-продуцентов ферментов, позволяющий не только восстановить утерянную активность культур, но и увеличить ее активность от 3 до 10 раз, а в некоторых случаях до 30 раз.*

Одной из центральных задач современной микробиологии является направленный биосинтез таких востребованных и важных активных веществ как ферменты и разработка способов повышения их образования. При отработке технологии получения ферментов необходимо стремиться к возможно более полному использованию биологического потенциала применяемых штаммов микроорганизмов и вести процесс биосинтеза с максимальной интенсивностью. Зная основные биологические возможности выбранных продуцентов ферментов и параметры их образования, можно создать необходимые условия культивирования и получить заданную производительность ферментационного процесса.

Значительное количество гидролитических ферментов образуют некоторые штаммы микромицетов и бактерий. Но большей агрессивностью в расщеплений органических субстратов

обладают микромицеты благодаря наличию более мощного биологического потенциала, определяемого набором и количеством образуемых ферментов. Вот почему при производстве ферментов предпочтение при выборе продуцентов отдают микромицетам.

Для нормального развития продуцентов ферментов существенное значение имеет правильное выявление оптимальных компонентов питательной среды и их концентраций. Одной из важных составляющих питательной среды является источник углерода. Он служит не только питательным субстратом для микроорганизмов и источником энергии, но и способен иногда вызывать индукцию образования гидролитических ферментов, таких как к примеру амилаза и пектиназа. Нами ранее было установлено, что культура *Asp.oryzae 3-9-15* для своего роста и развития, а также для максимального достижения образования  $\alpha$ -амилазной активности в качестве источника углерода использует крахмал и продукты неполного его гидролиза. Для максимальной биосинтеза пектинрасщепляющих ферментов (ПР) нами установлено также, что необходимо присутствие в среде не только легкоусвояемых углеводов, но и пектина, который индуцировал биосинтез фермента у *Asp.niger П* и *Asp.awamori*. Образование ферментов заметно репрессировалось при концентрации легкометаболизируемых источников углерода свыше 2%; в этом случае наблюдали разное понижение процесса образование ПР ферментов. При использовании в качестве источника углерода смеси лактозы с пектином, мы наблюдали максимум образовали ферментов у *Asp.niger П* (табл. 1).

Таблица 1. Влияние источников углерода и их смесей в среде на рост культуры и образование ПР ферментов свободными клетками *Asp.niger П*

Источники углерода в среде	Вес сухого мицелия	ПкА, ед/мл	Продуцирующая способность 1 г мицелия, ед/г	Добавлено пектина (0,5%)		Продуцирующая способность, ед/г мицелия
				Вес сухого мицелия,г	Пк А, ед/мл	
Пектин	0,332	4,18	12,59	-	-	-
Крахмал	0,210	0,74	3,52	0,700	4,24	1,42
Инулин	0,280	0,50	1,79	0,700	1,98	2,83
Лактоза	0,020	0	-	0,330	10,14	30,72
Сахароза	0,270	0,84	3,11	1,190	3,52	2,68
Мальтоза	0,265	0,72	2,72	0,680	2,40	3,52
Фруктоза	0,140	0	-	0,700	4,06	5,80
Галактоза	0,9	0	-	0,470	1,44	3,06
Глюкоза	0,225	0	-	0,680	2,28	3,35
Глицерин	0,020	0	-	0,540	1,26	2,33

Это объясняется тем, что пектин индуцирует биосинтез ферментов, скорость потребления которого выше, чем лактозы. Лактоза же медленно гидролизует и при постепенном потреблении усиливает биосинтез ферментов. Малые концентрации высвобождающейся глюкозы и галактозы не вызывают репрессии синтеза пектинрасщепляющих ферментов. При использовании же в качестве источника углерода пектина в сочетании с легкометаболизируемыми углеводами в больших концентрациях наступает катаболитная репрессия. Поэтому легкометаболизируемые источники углерода необходимо подавать в среду в ограниченном количестве.

Известные до сих пор способы культивирования продуцентов гидролитических ферментов, создающие благоприятные условия для роста и развития культур микроорганизмов, содержат оптимальный источник углерода, азота и минеральные соли. Однако недостатком этих способов является невысокий уровень биосинтеза гидролитических ферментов при пышном росте продуцентов. Для увеличения биосинтеза  $\alpha$ -амилазы, повышения продуктивности культуры целесообразно применять ингибиторы роста микромицетов – производные оксифосфоната гетероциклического ряда (табл. 2).

Таблица 2. Влияние различных концентраций производных нитразоацетона на образование  $\alpha$ -амилазы *Asp.oryzae 3-9-15*

Испытуемые вещества	Амилолитическая активность, ед/мл					
	Дозировки, г/л					
	без добавления	0,00015	0,0005	0,002	0,008	0,015
Контроль без добавления	4,24	-	-	-	-	-

испытуемых веществ...						
ИЗО-1	-	10,0	12,0	9,0	-	нет роста
ИЗО-2	-	9,0	11,0	9,0	-	нет роста
ИЗО-3		7,0	9,0	-	-	нет роста
ИЗО-4		7,0	9,0	1,0	-	нет роста
ИЗО-5		1,2	5,0	-	-	нет роста

Эти ингибиторы задавали в среду в количестве 0,0005 г/мл, что приводило к увеличению биосинтеза  $\alpha$ -амилазы более чем в 2-3 раза [1].

Действие этих веществ основано на угнетении роста культуры, вызывая изменения структуры клетки. Ультраструктурные исследования показали, что клетка, борясь за выживания, образует дыры в плазмолемме. Эти образования возможно способствовали большему вытеканию образовавшихся ферментов из клетки в культуральную жидкость, увеличивая ее активность в 2-3 раза.

Усиление синтеза ферментов достигалось нами не только путем подбора активных продуцентов, введением специфических индукторов, подбором состава питательной среды и оптимальных значений рН роста в процессе культивирования, но и путем введения неспецифических эффекторов, ингибиторов и активаторов роста микромицетов [2].

Изучение физиологии микромицетов тесным образом связано с методом культивирования. В условиях глубинного культивирования мицелиальные грибы растут в виде пеллетов. Нами обоснован новый принцип культивирования микромицетов, отличный от традиционного глубинного метода культивирования. В предложенном методе культивирования микромицеты растут на подложке в глубинных условиях роста в рыхлой нитчато-губчатой структуре. Создавая условия благоприятные для их роста, мы преследовали цель формирования вегетативного мицелия при глубинном культивировании клеток в естественной нитевидной форме без скручивания гиф в шарики путем удлинения и разветвления нитей в линейном направлении на поверхности подложки с максимумом доступа к клеткам кислорода и питательных веществ [3;4].

Разработанный метод культивирования иммобилизованных клеток в нитчато-губчатых структурах отработывался на промышленных штаммах продуцентов гидролитических ферментов –  $\alpha$ -амилазы и ПР фермент. *Asp.niger* II и *Asp.oryzae* 3-9-15 и подтвержден на продуцентах протеолитически ферментов, коллагеназы и лиазы (*Asp. awamori* 21/96, *Penicillium cyclospium*-2-11) [5;6].

Вследствие ряда факторов: иммобилизации клеток и роста продуцентов в нитчато-губчатой структуре, накопления значительной концентрации активной биомассы на подложке, биосинтеза ферментов системой клеток, увеличением клеточной проницаемости, происходит возрастание ферментативной активности культуральной жидкости от 2 до 10 раз (в зависимости от этапов процесса), удлинение стационарной стадии активного ферментообразования в 3-5 раз; значительно увеличивается общий срок культивирования продуцента, обеспечивается многократность использования иммобилизованной культуры и получения целевого продукта.

Производство ферментных препаратов, основанное на использовании микромицетов – наиболее мощных производителей энзимов, может быть рентабельным лишь при условии применения высокоактивных продуцентов. Поэтому задача получения высокоактивных штаммов продуцентов ферментов является первоочередной и актуальной [7-10].

В отличие от непрерывного культивирования микроорганизмов, полунепрерывное выращивание иммобилизованной культуры с периодической сменой питательной среды создает условия для формирования гетерогенной системы популяции с многообразием вариантов. Изменчивость, формирование большого разнообразия микромицетов в условиях иммобилизации и полунепрерывного культивирования является установленным нами фактом. Среди множества вариантов, возникших в процессе длительного выращивания иммобилизованной культуры отбирались только те, которые были намного активнее по ферментообразующим свойствам [11,12].

Таким образом, создан один из эффективных методов селекции микромицетов – продуцентов ферментов. Метод основан на отборе новых более активных форм микроорганизмов из непрерывно выращиваемой длительное время на твердой подложке иммобилизованной культуры в условиях полунепрерывной смены питательной среды. Этот метод позволил получить высокоактивные штаммы микромицетов по протеолитической, коллагеназной и лиазной активности.

1. Азербаяев И.Н., Блыва Р.К. и др. Способ культивирования продуцентов амилазы. Патент РФ №513074.
2. Блыва Р.К. Абиюров К.И. и др. Способ получения пектиназы. Патент РФ №696051.

3. Steliana Clapco. Селекция некоторых штаммов микромицетов продуцентов пектолитических ферментов и оптимизация условий развития и биосинтеза: Автореф. .... докт.биол.наук. – Румыния, 2006. – 26 с.
4. Блиева Р.К. Устройство для культивирования микроорганизмов в нитчато-губчатой структуре. Патент РФ №1047954.
5. Блиева Р.К. Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение преимущества культивирования микромицетов-продуцентов ферментов в нитчато-губчатой структуре перед пеллетами (Биологические подходы к решению актуальных проблем...) Кызылорда, - 2011. - С. 111-114.
6. Сафуани Ж.Е. Биосинтез протеолитических ферментов иммобилизованной культуры *Aspergillus awamori* 2-10 и использование их для мягчения конского мяса: Автореф. ... канд.биол.наук. – Алматы, 2005. – 17 с.
7. Калиева А.К. *Penicillium cyclopium* 2-11 пектинлиаза ферменттерінін биосинтезі және оларды синтетикалық жуғыш заттарда іс жүзінде қолдану: Автореф. ... канд.биол.наук. – Алматы, 2006. - 17 с.
8. Шигаева М.Х. Селекция дрожжей. – Алма-ата: Наука, 1975. – 150 с.
9. Steliana Clapco. Селекция некоторых штаммов микромицетов продуцентов пектолитических ферментов и оптимизация условий развития и биосинтеза. - Автореф. .... докт.биол.наук. – Румыния, 2006. – 26 с.
10. Михайлова Р.В., Семашко Т.В., Лобанок А.Г. и др. Спонтанная изменчивость *Penicillium funiculosum* (штамм БИМ 7-15) – продуцента глюкозооксидазы // Микробиология и фитопатология. – 2001. – Т.35. – Вып.5. – С. 73-79.
11. Михайлова Р.В., Жуковская Л.А., Лобанок А.Г. Изучение спонтанной изменчивости *Penicillium adamezii* ЛФ F-2044 – продуцента глюкозооксидазы // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43. - №2. – С. 229-233.
12. Блиева Р.К., Искакбаева Ж.А. Селекция микромицетов-продуцентов ферментов // Биотехнология. Теория и практика, - 2008. - №2. - С. 24-30.

\*\*\*

Бұл мақалда көп жылдар бойы әртүрлі өндіріс аумағына және ауылшаруашылықта қолданылатын энзимдердің биосинтезін жоғарылату жолдары зерттеулеріне нәтиже берілген. Ферменттердің мақсатты биосинтезі үшін физиологиялық бақылау жүргізілуі керек екені көрсетілген және микромицеттерді экономикалық жағынан тиімді әрі өнімділігін жоғарылату мақсатында жіпті-губкалы құрылымдағы табаншаларды қолдану әдісі өңделген. Ферменттердің микромицет-продуценттерінің жоғалған белсенділігін қалпына келтіретін және белсенділігін 3-тен 10 есеге дейін көтеретін, кейбір жағдайда 30 есеге дейін жоғарылатын тиімді селекцияның әдісі өңделген.

УДК 579:631.811.98

*Ж.Т. Ботбаева, А.П. Науанова, Р. Ж. Әбдүкерім*

#### РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО БИОФУНГИЦИДА – СТИМУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

(Казахский агротехнический университет им. С Сейфуллина, e-mail: [zhanar.b.t@mail.ru](mailto:zhanar.b.t@mail.ru))

*В этой статье представлены методы разработки эффективного биофунгицида на основе селекционных активных штаммов бактерий рода *Bacillus*, которые были генотипированы по гену *16s* РНК. Определено распространение и развитие фузариозно-гельминтоспорозной инфекции, а также корневой гнили зерновых культур. Определена биологическая и выявлена хозяйственная эффективность использования биофунгицида в технологиях выращивания пшеницы.*

Заболевания растений являются одним из факторов, серьезно ограничивающих продуктивность сельского хозяйства во всем мире. Ежегодный ущерб, причиняемый фитопатогенными микроорганизмами, значительная часть которых представлена паразитическими грибами, составляет, по разным оценкам, от 15 до 20% общей продуктивности мирового растениеводства [1].

Сегодня практически нет незараженных семян и, в зависимости от погодных условий, в период вегетации семена могут быть заражены до 70%. В семенном фонде большинства хозяйств, практически отсутствует здоровый материал, почти каждая партия семян в той или иной мере заражена различными патогенными микроорганизмами. Так, на ячмене преобладают *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, виды родов *Alternaria*, *Fusarium*. Во влажные годы в общем комплексе грибов на семенах ячменя встречаемость *Bipolaris sorokiniana* может достигать 47,6%, видов р. *Alternaria* – 31,7%, р. *Fusarium* – 17,5%; на озимой пшенице – видов р. *Alternaria* – 51,7%, р. *Fusarium* – до 15%. Пораженность семян различных сортов яровой пшеницы находится в пределах 47,5 – 62,3%, из них р. *Fusarium* – 23 – 37,5%, р. *Alternaria* – 10 – 34,4% [2, 3].

В настоящее время стратегия биологического метода защиты растений от болезней не ставит задачу полного уничтожения вредных организмов, а ориентирует на регулирование популяции патогена на уровне ниже экономического порога вредоносности [4]. В связи с этим применение микробиологических средств защиты растений требует глубокого изучения биологических особенностей взаимоотношения патогена с растением – хозяином и почвенным микробным ценозом. В борьбе с грибными болезнями сельскохозяйственных культур перспективно использование микробов – антагонистов. Они снижают пораженность растений болезнями, стимулируют рост и развитие, увеличивают урожайность, не загрязняют окружающую среду [3, 4, 5]. Против возбудителей корневой гнили разработаны способы обогащения ризосферы зерновых культур антагонистами путем обработки