

УДК 630.86 + 674.031.623.237.7:630.86

СОСТАВ, СВОЙСТВА И ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ ВЕГЕТАТИВНОЙ ЧАСТИ ТОПОЛЯ ПОСЛЕ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. СООБЩЕНИЕ 3. ПОЛУЧЕНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA*

© *Е.В. Исаева**, *О.О. Мамаева*, *Т.В. Рязанова*

*Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнёва, пр. Мира, 82, Красноярск, 660049 (Россия),
e-mail: isaevaelena08@mail.ru*

Цель настоящей работы – оценка пригодности твердых и жидких отходов, образующихся при переработке вегетативной части тополя, в качестве субстратов для биохимической переработки с целью получения биопрепаратов различного назначения. Для исследования использовали послеэкстракционные остатки, а также кубовую жидкость, образующиеся после отгонки эфирных масел и извлечения спирторастворимых веществ из вегетативной части тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.). В качестве биодеструктора использованы сибирские штаммы грибов рода *Trichoderma*.

Исследования показали, что вегетативная часть тополя и ее отдельные элементы являются доступным субстратом для роста мицелиальных грибов. Высокий выход спор (4.5×10^9 КОЕ/г) и образование в процессе твердофазного культивирования штамма МГ-97 грибов рода *Trichoderma* гуминовых веществ (11%), применяемых в качестве стимуляторов роста растений, дает основание использовать вегетативную часть тополя в качестве технологического сырья для получения биопрепарата типа «Триходермин» или гумификации почвы. В зависимости от назначения препаратов продолжительность культивирования можно варьировать: для получения биопрепарата сельскохозяйственного назначения до 15 сут, более – для гумификации почвы. Включение кубовой жидкости на стадии увлажнения субстрата позволяет получить биопрепарат с более высоким титром спор (5×10^9 КОЕ/г), дает возможность замкнуть цикл водопотребления и сделать технологию переработки вегетативной части тополя безотходной.

Ключевые слова: тополь, вегетативная часть, твердофазное культивирование, биопрепарат.

Введение

В последнее время уделяется большое внимание разработке технологий биоконверсии растительных отходов с помощью микроорганизмов с целью получения продуктов различного назначения. В этом аспекте в качестве деструкторов особое внимание уделяется грибам, имеющим активную ферментативную систему.

Грибы, разлагающие растительное сырье, используют его в качестве субстрата, в котором при их воздействии происходят изменения в химическом составе, во внутренней структуре и строении, в результате чего изменяются физические свойства сырья [1]. Разложение растительной массы грибами происходит по-разному, характер распада зависит как от свойств растительного материала, так и от вида гриба.

Грибы, разрушающие растительное сырье, можно разделить на две основные группы: целлюлозоразрушающие и лигнинразрушающие. Наиболее мощные разрушители целлюлозы – виды *Stachybotrus*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Myrothcium* – относятся

Исаева Елена Владимировна – доктор технических наук, профессор, профессор кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391)227-36-54, e-mail: isaevaelena08@mail.ru

Мамаева Ольга Олеговна – аспирант, e-mail: olga07_95@mail.ru

Рязанова Татьяна Васильевна – профессор кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-52-77, e-mail: tatyana-htd09@mail.ru

к числу почвенных несовершенных грибов, или аскомицетов, и обладают обширным набором целлюлитических ферментов.

Чаще всего грибы рода *Trichoderma* встречаются на различных растительных, в особенности

* Автор, с которым следует вести переписку.

богатых целлюлозой, субстратах, в почве на грубых кормах, в основном на более старых стеблях корневых растений. Изредка встречаются на соломе, редко на сене злаков, преимущественно расположенных на земле, нижних слоях скирд, смоченных дождем, на разлагающихся органических остатках [2]. Грибы рода *Trichoderma* могут самостоятельно вызвать разрушение древесины [3].

Грибы рода *Trichoderma* известны как активные продуценты комплекса ферментов, среди них целлюлаза является ведущей [4, 5]. Грибы активно растут и образуют целлюлолитические ферменты и антибиотические вещества на природных субстратах и различных растительных отходах [6–9].

Для выращивания грибов рода *Trichoderma* обычно используют жидкие и твердые (агаризованные) синтетические питательные среды (сусло-агар, среда Чапека, среда Захарченко, пивное сусло), а также естественные материалы-отходы или побочные продукты пищевой, перерабатывающей промышленности, богатые органическими веществами (гидролизаты древесины, меласса, барда, жом, зерноотходы, виноградная выжимка, торф), которые применяют после предварительной стерилизации. Максимально возможное накопление всех ферментов, входящих в целлюлазный комплекс, происходит при поверхностном способе культивирования микроорганизмов [9, 10].

Грибы рода *Trichoderma*, развиваясь на субстратах, содержащих целлюлозу в большом количестве, могут успешно конкурировать с другими видами. Грибы рода *Trichoderma* входят в ограниченную группу разрушителей лигнина. Способность грибов осуществлять глубокое разрушение лигнина представляет собой уникальное явление. Однако антагонистические свойства гриба снижаются на субстратах с меньшим содержанием целлюлозы даже при более благоприятных условиях [9, 11–13].

Во всем мире занимаются разработкой разных форм биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* [14–16]. В качестве питательных сред для получения биопрепарата используются такие растительные материалы, как зерновки овса, ячменя, пшеницы, кукурузы (триходермин-1), солома, трава, отходы зерна (триходермин-2), торф (триходермин-3), однако формы этого препарата не отвечают требованиям современного крупнотоннажного производства с высоким титром спор.

Споры гриба рода *Trichoderma* составляют основу отечественного биопрепарата «Триходермин», который используется для регуляции численности многих фитопатогенных микромицетов – возбудителей ризоктониза картофеля, [17] корнееда свеклы, сосудистого бактериоза капусты, корневых гнилей злаков, сосудистых микозов сеянцев хвойных пород [18]. Применение Триходермина в течение вегетации приводит к увеличению урожайности и улучшению фитосанитарного состояния грунтов [19].

В этой связи одним из перспективных направлений является получение биопрепаратов путем биоконверсии лигноуглеводных отходов, обеспечивающее существование и функционирование безотходных и ресурсосберегающих технологий в промышленности и сельском хозяйстве.

В работах последних лет показана возможность получения различных биопрепаратов на отходах деревообрабатывающей промышленности (например, кора, одубина коры), нетрадиционных отходах сельского хозяйства (топинамбур), и сделан акцент на использование в практике защиты растений аборигенных штаммов грибов рода *Trichoderma* [18, 20–22]. К числу перспективных субстратов для культивирования грибов этого рода можно отнести и вегетативную часть тополя бальзамического после извлечения из нее биологически активных веществ, имеющих самостоятельное применение [23–26].

Предварительные эксперименты, проведенные на исходных почках тополя, показали их непригодность для биоконверсии микроорганизмами. Субстрат не зарастал мицелием гриба и конидиеспоры не образовывались даже на 20-й день культивирования. Очевидно, это связано с тем, что в составе экстрактивных веществ почек тополя содержатся терпеноиды, низкомолекулярные фенолы, а также флавононы – пиностробин и пиноцембрин, которые обладают бактерицидным действием и являются ингибиторами роста микроорганизмов, поэтому их присутствие негативно сказывается на качестве субстратов для культивирования микроорганизмов [26]. Подтверждением этому служат и результаты наших исследований антимикробной активности эфирных масел и спиртового экстракта, полученных из почек тополя бальзамического. Установлено, что и эфирные масла, и спиртовой экстракт проявляют антифунгальную активность в отношении фитопатогенных штаммов грибов рода *Fusarium*, бактериостатическое и бактерицидное действие по отношению, в частности, к бактериям рода *Staphylococcus* [27].

При выборе конкретного вида сырья в качестве субстрата необходимо проведение дополнительных исследований по конидиогенезу, установлению степени трансформации исходных компонентов, поскольку от этих показателей будет зависеть направление использования биопрепарата.

Целью работы являлась оценка пригодности твердых и жидких отходов, образующихся при переработке вегетативной части тополя, в качестве субстратов для биохимической переработки с целью получения биопрепаратов различного назначения.

Экспериментальная часть

Для исследования в качестве субстратов использовали послеэкстракционные остатки, образующиеся после отгонки эфирных масел и извлечения спирторастворимых веществ из вегетативной части (почки, почки с побегами), также твердые остатки после извлечения экстрактивных веществ из листьев тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L). Твердые остатки имели размер частиц 3–5 мм и были высушены до воздушно-сухого состояния.

Пробы зеленых листьев были отобраны в июле 2016 г. Из листьев удаляли спирто- и водорастворимые вещества, высушивали, измельчали до 2–5 мм и хранили в закрытых сосудах при постоянной влажности.

Кроме того, для интенсификации процесса биоконверсии использовали кубовую жидкость, образующуюся в процессе отгонки из вегетативной части тополя эфирных масел, в составе которой находится до 35% редуцирующих веществ, порядка 5% минеральных веществ, 7% белка и микроэлементы (медь, цинк, марганец) [23].

Химический состав субстратов определяли, используя общепринятые в химии растительного сырья методы [28]. Влажность сырья определяли методом выслушивания навески сырья до постоянной массы при 105 °С, зольные компоненты – сжиганием навески сырья с последующим прокаливанием в муфельной печи при 600 °С. Гидролиз легкогидролизуемых полисахаридов проводили путем кипячения с 2%-й соляной кислотой в течение трех часов, трудногидролизуемых полисахаридов – 80%-й серной кислотой при комнатной температуре в течение двух часов. Для количественного определения лигниновых веществ как негидролизуемого остатка растительной ткани использовали метод гидролиза 72%-й серной кислотой в модификации Комарова. Эфирные масла выделяли методом гидродистилляции на модифицированном аппарате Клевенджера, экстрактивные вещества – последовательной исчерпывающей экстракцией 96%-м этанолом и водой [28]. Липиды извлекали модифицированным методом Блая и Дайера смесью растворителей хлороформ-изопропанол в соотношении 1 : 2 по объему и разделяли на фракции методом колоночной хроматографии на силикагеле L100/250 [29].

В качестве биодеструктирующего агента использовались изоляты грибов рода *Trichoderma* анаморфа *Hypocrea gelatinosa* Bisset, выделенные из ризопланы семян хвойных пород и почв Маганского лесопитомника д.б.н. Т.И. Громовых в 1997 г.: штамм «Маганский-97 *T. asperellum* (ВКПМ F-765). Sect. *Trichoderma*; штамм О-97 *T. virens* (Miller et al.) Arx. Sect. *Pachybasim*; штамм МК *T. koningii* Oudemans et Koning Sect. Штаммы М99-9 (*T. asperellum*) и К6-15 любезно предоставлены д.б.н. Ю.А. Литовка. Штамм М99-9 выделен из почв Мининского лесного питомника (Емельяновский район, Красноярский край) в 1999 г., а штамм К6-15 – из древесины кедра на территории дендрария Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск, Академгородок) в 2015 г. Штамм Универсальный *T. harzianum* Rifai. Sect. *Pachybasium* выделен из агроценоза Восточной Сибири д.б.н. Б.Н. Огарковым. Штамм является производственной культурой, предоставлен Краевой станцией защиты растений г. Красноярска.

Культивирование грибов проводили в чашках Петри, которые заполняли субстратом в количестве 20 г с влажностью 70–75% и стерилизовали в автоклаве ВК-75 в течение 30 мин под давлением 1.01×10^5 Па. Для получения инокулята штамм гриба рода *Trichoderma* размножали глубинным методом культивирования в течение 24 ч на среде Чапека. Далее посевной материал (из расчета 1×10^6 спор на 1 г) соединяли с увлажненным субстратом в чашках Петри. После посева субстрат культивировали в термостате при температуре (26 ± 2) °С. Подсчет количества спор (КОЕ) осуществляли с помощью камеры Горяева.

Обсуждение результатов

Предварительную оценку склонности послеэкстракционных твердых остатков почек и листьев тополя к биоконверсии проводили, используя в качестве биодеструкторов аборигенные штаммы грибов рода *Trichoderma*: *T. asperellum*, *T. koningii*, *T. virens* и *T. harzianum*, обладающие как целлюлазной, так и лакказной активностью [6, 18, 19].

Результаты показали, что на остатке почек после гидродистилляции эфирных масел все штаммы образовывали мицелий, но более активно штаммы МГ-97 *T. asprellum* и 10-99 *T. harzianum*, которые и были использованы в дальнейшей работе. Целлюлолитическая активность штаммов приближалась к активности промышленного штамма «Универсальный», лигнолитическая – превосходила ее. В частности, в варианте с использованием штамма «МГ-97» убыль лигниновых веществ субстрата превысила на 9% таковую для штамма «Универсальный» в процессе культивирования в течение 30 сут [30].

При культивировании штаммов МГ-97 и 10-99 в течение 32 сут на остатке почек тополя после извлечения эфирных масел были получены следующие результаты. Поверхность субстрата зарастала мицелием гриба уже на седьмые сутки. При аналогичных условиях культивирования более раннее начало конидиеобразования (на третьи сутки культивирования) для данных штаммов отмечалось на стеблях топинамбура. На таких лигноуглеводных субстратах, как кора лиственницы и одубина, начало образования конидий наступало на 15-е и 19-е сутки соответственно [31].

Результаты определения урожая конидий исследуемых грибов рода *Trichoderma* и убыли массы образца в динамике представлены таблице 1.

Как следует из таблицы 1, максимальное увеличение выхода конидий наблюдалось на 32-е сутки, при этом в процессе культивирования используемые штаммы гриба вели себя по-разному. Спорообразование у гриба штамма 10-99 происходило равномерно в течение всего процесса культивирования. Такое поведение гриба характерно и для таких субстратов, как кора и одубина коры лиственницы [30], выход же конидий на почках тополя в 10 раз выше по сравнению с упомянутыми субстратами. Динамика образования спор такова: на 15-е сутки культивирования количество спор у грибов обоих штаммов возрастало в 1.2 раза; по истечении 28 сут количество спор штамма 10-99 увеличивалось в 1.1 раза, штамма МГ-97 – в 1.5 раза. За последующие пять суток культивирования количество спор штамма МГ-97 увеличивалось в три раза, и его активность становилась преобладающей над штаммом 10-99. Максимальное накопление спор и максимальное уменьшение массы образцов наблюдалось на 32-е сутки культивирования обоих штаммов грибов рода *Trichoderma*.

При сравнении полученных данных для изолятов грибов, использованных в эксперименте, не обнаружено наличия корреляции между убылью биомассы и интенсивностью конидиеобразования, поскольку согласно природе штамма, при активном развитии мицелия, сопровождающимся уменьшением массы субстрата, увеличения количества спор может не наблюдаться [1].

Проведенные исследования показали, что получаемый препарат при культивировании штамма МГ-97 на послеэкстракционном остатке почек тополя имеет титр спор в два раза выше, чем другие штаммы, в частности штамм 10-99, поэтому в дальнейших исследованиях биоконверсии послеэкстракционных остатков вегетативной части тополя бальзамического был использован только штамм МГ-97 *T. asprellum*.

Для оценки склонности к биоконверсии послеэкстракционного остатка из листьев тополя бальзамического использовали штаммы М99-9 и К6-15 *T. asprellum*, которые более активно образовывали мицелий. Результаты приведены в таблице 2.

На послеэкстракционном остатке листьев процесс конидиегенеза протекает более интенсивно, чем на остатках почек тополя. Максимальное количество спор образуется за 14 сут, дальнейшее увеличение продолжительности культивирования не приводит к увеличению содержания колониеобразующих единиц. Убыль массы субстратов достигает 18%. Таким образом, послеэкстракционные остатки листьев тополя являются доступным субстратом для роста мицелиальных грибов и могут быть использованы в составе субстратов для получения биопрепаратов.

Таблица 1. Выход конидий грибов рода *Trichoderma* и убыль массы твердого остатка почек тополя бальзамического после извлечения эфирных масел

| Продолжительность культивирования, сут | Штамм биодеструктора | | | |
|--|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| | 10-99 | | МГ-97 | |
| | титр, $\times 10^8$ спор/г | убыль массы, % | титр, $\times 10^8$ спор/г | убыль массы, % |
| 10 | 5.2 | 7.0 | 2.7 | 6.5 |
| 15 | 6.1 | 10.9 | 3.2 | 10.1 |
| 28 | 6.7 | 18.5 | 4.0 | 15.8 |
| 32 | 7.0 | 20.6 | 12.0 | 19.0 |

Таблица 2. Конидиогенез грибов рода *Trichoderma* на послеэкстракционных остатках листьев

| Субстрат | Штамм | Титр спор, 10 ⁸ спор/г | | |
|--|-------|-----------------------------------|--------|--------|
| | | 7 сут | 11 сут | 14 сут |
| Зеленые листья | M99-9 | 8.6 | 16.5 | 23.3 |
| | K6-15 | 7.4 | 21.1 | 35.6 |
| Остаток после экстракции листьев водой и спиртом | M99-9 | 1.3 | 2.9 | 4.1 |
| | K6-15 | 2.3 | 3.9 | 4.7 |
| Остаток после экстракции листьев водой | M99-9 | 7.9 | 14.4 | 25.1 |
| | K6-15 | 4.2 | 10.1 | 18.7 |

Существенное влияние на эффективность процесса культивирования оказывает способ внесения посевного материала. Нами установлено, что засев мицелием приводит к увеличению титра спор, снижению продолжительности культивирования, более глубокой деструкции лигноуглеводного комплекса субстрата [24].

На следующем этапе работы осуществляли культивирование на твердых остатках, полученных в процессе переработки вегетативной части тополя при извлечении эфирных масел и спирторастворимых веществ, где в качестве посевного материала использовали суспензию пропагул штамма «МГ-97» *T. Aspirellum*, как наиболее урожайного.

Для биодеструкции в качестве субстратов использовали:

- твердый остаток почек тополя после гидродистилляции эфирных масел (субстрат I);
- твердый остаток почек тополя после удаления эфирных масел и извлечения этиловым спиртом экстрактивных веществ (субстрат II);
- твердый остаток почек тополя после извлечения только спирторастворимых веществ (субстрат III);
- твердый остаток вегетативной части тополя (побеги с почками) после исчерпывающего извлечения этиловым спиртом экстрактивных веществ (субстрат IV).

Микробиологическую конверсию остатков проводили в течение 30 сут, с отбором проб на 5-е, 10-е, 15-е, 20-е и 30-е сутки от начала культивирования.

Визуальные наблюдения показали, что в процессе культивирования уже на третьи сутки поверхность субстратов II–IV зарастала мицелием гриба, в то время как массовое спорообразование у штамма «МГ-97» *T. aspirellum* на субстрате I начиналось на 7-е сутки культивирования.

Урожай колониеобразующих единиц на различных субстратах тополя представлен в таблице 3.

Из данных таблицы 3 следует, что на протяжении всего времени культивирования более интенсивный процесс конидиеобразования наблюдался на субстрате II. Уже на 15-е сутки урожай составлял 4.27×10^9 КОЕ на 1 г субстрата, что в 1.4 раза больше, чем на субстрате III и в 1.7 раза, – чем на субстрате IV (вегетативная часть тополя). Дальнейшее увеличение продолжительности культивирования на твердых остатках почек и вегетативной части тополя после удаления экстрактивных веществ не приводило к значительному увеличению содержания КОЕ.

В конце процесса культивирования убыль массы для субстрата II достигла 30%, для субстратов I и IV – 25–26%. Исключение составляет субстрат III, где наибольшая убыль массы отмечалась на 20-й день культивирования (22.5%). В последующие 10 дней убыли массы не отмечено.

Сравнение полученных результатов для штамма МГ-97 при культивировании на различных субстратах еще раз показало, что убыль массы и выход спор не имеют линейной зависимости.

Изменения химического состава твердого остатка почек тополя после отгонки эфирных масел в процессе культивирования приведены в таблице 4.

Таблица 3. Урожай конидиеспор на различных субстратах тополя

| Продолжительность культивирования, сутки | Содержание КОЕ на 1 г субстрата | | | |
|--|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | субстрат I | субстрат II | субстрат III | субстрат IV |
| 5 | 9.76×10^6 | 2.90×10^7 | 1.20×10^7 | 1.82×10^7 |
| 10 | 2.09×10^7 | 1.65×10^8 | 1.19×10^8 | 1.23×10^8 |
| 15 | 2.77×10^7 | 4.27×10^9 | 3.12×10^9 | 2.48×10^9 |
| 20 | 2.49×10^8 | 4.35×10^9 | 3.64×10^9 | 3.83×10^9 |
| 30 | 2.58×10^8 | 4.48×10^9 | 3.66×10^9 | 3.89×10^9 |

Таблица 4. Химический состав субстрата I до и после биодеструкции, % от абсолютно сухого сырья

| Наименование компонента | Исходный субстрат | Продолжительность культивирования, сут | | | |
|----------------------------------|-------------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 10 | 15 | 20 | 30 |
| Минеральные вещества | 4.12 | <u>4.12</u> 3.59 | <u>4.11</u> 3.48 | <u>4.10</u> 3.12 | <u>4.11</u> 3.04 |
| Вещества, экстрагируемые спиртом | 37.67 | <u>37.34</u> 32.73 | <u>36.91</u> 31.26 | <u>36.55</u> 27.78 | <u>35.36</u> 26.09 |
| Вещества, экстрагируемые водой | 8.20 | <u>8.34</u> 7.27 | <u>8.57</u> 7.26 | <u>8.00</u> 6.08 | <u>8.54</u> 6.30 |
| Легкогидролизуемые полисахариды | 9.30 | <u>9.17</u> 7.99 | <u>9.04</u> 7.66 | <u>8.48</u> 6.44 | <u>7.10</u> 5.24 |
| Трудногидролизуемые полисахариды | 15.93 | <u>14.94</u> 13.03 | <u>14.55</u> 13.32 | <u>13.48</u> 9.86 | <u>13.07</u> 9.13 |
| Лигноподобные вещества | 20.81 | <u>19.70</u> 17.18 | <u>19.51</u> 16.52 | <u>18.47</u> 14.04 | <u>18.28</u> 13.49 |
| Гуминовые вещества | – | <u>2.50</u> 2.18 | <u>3.93</u> 3.33 | <u>7.91</u> 6.01 | <u>9.07</u> 6.69 |

Примечание. В числителе значения на абсолютно сухое вещество; в знаменателе – значения с учетом коэффициента убыли массы.

Результаты показывают, что культивирование штамма МГ-97 приводит к изменению содержания всех компонентов субстрата, при этом существенное влияние оказывает продолжительность воздействия микроорганизмов. Так, более значительные изменения в химическом составе субстрата происходили в начальный период культивирования, за первые 10 сут. Однако различные компоненты субстрата вели себя по-разному. Содержание полисахаридов снижалось на 1.4–2.9%, экстрагируемых водой и лигноподобных веществ – 1.1%, а экстрагируемых этанолом – 5% по отношению к абсолютно сухой массе исходного субстрата.

Увеличение продолжительности культивирования до 15 сут не привело к существенному изменению химического состава субстрата. Снижение количества основных компонентов по отношению к их содержанию в субстрате предыдущего периода не превысило 0.2–0.5%.

При культивировании в течение 20 сут и более наблюдалась более значительная убыль в содержании трудно- и легкогидролизуемых полисахаридов (на 1.2 и 4.5% соответственно), лигноподобных веществ (2.5%) и веществ, экстрагируемых этанолом (3.48%), относительно их содержания в субстрате предыдущего периода.

Грибы рода *Trichoderma* наряду с углеводами и лигноподобными веществами могут использовать в качестве источника углерода и вещества липидного характера. Об этом свидетельствуют результаты исследований, приведенные в таблице 5. Полученные результаты подтверждают, что в первую очередь конверсии подвержены нейтральные липиды.

В таблицах 6 и 7 приведены данные, свидетельствующие об изменении химического состава субстрата II и III в процессе их биоконверсии. Следует отметить, что эти субстраты отличаются от субстрата I меньшим содержанием экстрактивных веществ и большим содержанием веществ лигниновой природы.

Субстраты, полученные после удаления спирторастворимых веществ, оказались наиболее подвержены воздействию целлюлолитического комплекса ферментов, разрушающих целлюлозу, поскольку на стадиях подготовки из них были удалены экстрактивные вещества, заполняющие полости клеток, в силу чего доступность материала стала выше. Кроме того, часть экстрактивных веществ обладает ингибирующим действием, и их удаление интенсифицирует процесс биоконверсии.

Об изменениях, происходящих в субстратах в процессе биоконверсии, свидетельствуют и результаты химического анализа. Установлено, что за первые 10 сут культивирования на субстратах II и III содержание полисахаридов снизилось на 30–32%. Такой конверсии полисахариды на субстрате I достигают только на 20-е сут, при этом и выход КОЕ на два порядка ниже. Наибольшее снижение содержания целлюлозы (43–44%) отмечено к концу срока культивирования на всех субстратах. Убыль лигноподобных веществ также более значительна при культивировании штамма МГ-97 на субстратах с минимальным содержанием экстрактивных веществ. На субстрате II за первые 10 сут культивирования количество их снижается на 36%. Для остальных субстратов такое содержание лигноподобных веществ отмечается на 20-е и 30-е сутки культивирования. Трансформация компонентов субстрата IV, полученного на основе твердого остатка вегетативной части тополя, была аналогичной субстрату III после исчерпывающего экстрагирования [24].

Таблица 5. Содержание липидов в субстрате I до и после биодеструкции, % от суммы липидов

| Группа липидов | Исходный субстрат | Продолжительность культивирования, сутки | | |
|--------------------|-------------------|--|----|----|
| | | 10 | 30 | 40 |
| Нейтральные липиды | 86 | 61 | 48 | 30 |
| Гликолипиды | 12 | 32 | 41 | 50 |
| Фосфолипиды | 2 | 7 | 11 | 20 |

Таблица 6. Химический состав субстрата II до и после биодеструкции, % от абсолютно сухого сырья

| Наименование компонента | Исходный субстрат | Продолжительность культивирования, сут | | | |
|----------------------------------|-------------------|--|--------------|--------------|--------------|
| | | 10 | 15 | 20 | 30 |
| Минеральные вещества | 2.62 | <u>3.41</u> | <u>3.59</u> | <u>3.68</u> | <u>3.74</u> |
| | | 2.62 | 2.63 | 2.63 | 2.64 |
| Вещества, экстрагируемые водой | 4.50 | <u>7.30</u> | <u>7.46</u> | <u>7.62</u> | <u>7.40</u> |
| | | 5.61 | 5.47 | 5.45 | 5.22 |
| Легкогидролизуемые полисахариды | 16.05 | <u>14.17</u> | <u>13.98</u> | <u>13.75</u> | <u>13.58</u> |
| | | 10.9 | 10.25 | 9.83 | 9.58 |
| Трудногидролизуемые полисахариды | 22.10 | <u>19.35</u> | <u>18.59</u> | <u>18.04</u> | <u>17.60</u> |
| | | 14.88 | 13.63 | 12.9 | 12.42 |
| Лигноподобные вещества | 52.67 | <u>43.34</u> | <u>43.03</u> | <u>42.57</u> | <u>42.10</u> |
| | | 33.33 | 31.54 | 30.44 | 29.7 |
| Гуминовые вещества | – | <u>12.39</u> | <u>13.29</u> | <u>14.17</u> | <u>15.32</u> |
| | | 9.53 | 9.74 | 10.13 | 10.81 |

Примечание. В числителе значения на абсолютно сухое вещество; в знаменателе – значения с учетом коэффициента убыли массы.

Таблица 7. Химический состав субстрата III до и после биодеструкции, % от абсолютно сухого сырья

| Наименование компонента | Исходный субстрат | Продолжительность культивирования, сут | | | |
|----------------------------------|-------------------|--|--------------|--------------|--------------|
| | | 10 | 15 | 20 | 30 |
| Минеральные вещества | 2.62 | <u>3.22</u> | <u>3.31</u> | <u>3.41</u> | <u>3.57</u> |
| | | 2.62 | 2.63 | 2.63 | 2.63 |
| Вещества, экстрагируемые водой | 6.25 | <u>6.49</u> | <u>7.22</u> | <u>7.70</u> | <u>7.54</u> |
| | | 5.28 | 5.73 | 5.94 | 5.56 |
| Легкогидролизуемые полисахариды | 16.1 | <u>14.81</u> | <u>14.70</u> | <u>14.35</u> | <u>14.18</u> |
| | | 12.04 | 11.67 | 11.06 | 10.45 |
| Трудногидролизуемые полисахариды | 23.19 | <u>19.25</u> | <u>17.95</u> | <u>17.51</u> | <u>17.80</u> |
| | | 15.65 | 14.25 | 13.5 | 13.12 |
| Лигноподобные вещества | 49.77 | <u>44.44</u> | <u>43.80</u> | <u>41.56</u> | <u>41.13</u> |
| | | 36.13 | 34.78 | 32.04 | 30.31 |
| Гуминовые вещества | – | <u>11.55</u> | <u>12.71</u> | <u>15.02</u> | <u>15.20</u> |
| | | 9.39 | 10.09 | 11.58 | 11.20 |

Примечание. В числителе значения на абсолютно сухое вещество; в знаменателе – значения с учетом коэффициента убыли массы.

Деструкция лигноуглеводного комплекса субстратов сопровождается образованием гуминовых веществ, содержание которых составляет от 6.7% (субстрат I) до 11% (субстрат III). К ослаблению связи лигноуглеводного комплекса и окислению лигнина приводит усвоение грибами рода *Trichoderma* гемицеллюлоз [32]. Грибы в своей жизнедеятельности создают благоприятные условия для такого окисления, выделяя окислительные экзоэнзимы, что согласуется с данными других авторов [1, 18, 31]. Например, при биодеструкции коры и одубины лиственницы в течение 35 сут образуется 7.5–8.3% [31]. Значительное содержание веществ гумусового характера дает основание рекомендовать биодеструктированный остаток вегетативной части тополя в качестве структурообразователя почвы.

Таким образом, и вегетативную часть, и собственно почки тополя после извлечения экстрактивных веществ можно утилизировать с помощью грибов рода *Trichoderma*. В зависимости от назначения препаратов продолжительность процесса культивирования можно варьировать. Для получения биопрепарата типа «Триходермин» для сельского хозяйства она составляет до 15 сут, более – для гумификации почвы.

В процессе отгонки из вегетативной части тополя эфирных масел образуется кубовая жидкость, которую необходимо утилизировать. Кубовая жидкость представляет собой сумму водорастворимых веществ, переходящих в раствор в процессе гидродистилляции. В ее составе, согласно ранее проведенным исследованиям

[23], находится до 35% редуцирующих веществ, порядка 5% минеральных веществ, 7% белка и минеральные соединения (медь, цинк, марганец). Учитывая высокое содержание редуцирующих веществ, нами была исследована возможность использования кубовой жидкости с целью интенсификации процесса биоконверсии и создания замкнутого цикла водопотребления для увлажнения субстрата на стадии подготовки его к биоконверсии. Для эксперимента был выбран субстрат II, который перед внесением мицелия увлажняли кубовой жидкостью. Культивирование проводили в течение 15 сут, результаты представлены в таблице 8.

На увлажненном кубовой жидкостью субстрате отмечался более интенсивный рост КОЕ по сравнению с исходным субстратом (табл. 6). Как следует из таблицы 8, в процессе биоконверсии потеря в массе субстрата, увлажненного кубовой жидкостью, как и стерильной водой, к 15-м суткам культивирования также составила 27%, выход же конидий в 1.2 раза выше. Установлено, что на пятнадцатые сутки культивирования содержание полисахаридов снизилось на 28%, лигноподобных веществ на 38% и увеличилось содержание гуминовых веществ до 7%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что кубовая жидкость может быть использована в качестве питательной и стимулирующей добавки к субстратам. Дополнительное обогащение субстрата минеральными соединениями (медь, цинк, марганец), азотсодержащими веществами и углеводами, содержащимися в кубовой жидкости, позволяет получить биопрепарат с высоким титром спор и утилизировать кубовую жидкость.

Таблица 8. Урожай конидиеспор гриба рода *T. asperellum* и убыль массы субстрата II, увлажненного кубовой жидкостью

| Продолжительность, сутки | Титр спор на 1 г субстрата | Коэффициент убыли массы |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 5 | 3.4×10^7 | 0.82 |
| 10 | 1.9×10^8 | 0.75 |
| 15 | 5.1×10^9 | 0.73 |

Выводы

Таким образом, исследования показали, что вегетативная часть тополя и ее отдельные элементы являются доступным субстратом для роста мицелиальных грибов. Высокий выход спор и образование в процессе культивирования изолятов грибов рода *Trichoderma* гуминовых веществ, применяемых в качестве стимуляторов роста растений, дает основание использовать вегетативную часть тополя в качестве технологического сырья для получения биопрепарата типа «Триходермин» или гумификации почвы. В зависимости от назначения препаратов продолжительность культивирования можно варьировать: для получения биопрепарата сельскохозяйственного назначения до 15 сут, более – для гумификации почвы. Включение кубовой жидкости на стадии увлажнения субстрата позволяет получить биопрепарат с более высоким титром спор (5×10^9 КОЕ/г), дает возможность замкнуть цикл водопотребления и сделать технологию переработки вегетативной части тополя безотходной

Список литературы

1. Рипачек В.И. Биология дереворазрушающих грибов. М., 1967. 276 с.
2. Скрябин Г.К. Глубинная и твердофазная ферментация соломы и опилок // Микология и фитопатология. 1986. №5. С. 976–983.
3. Махова Е.Г., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Биодеструкция листовенничной одубины грибами рода *Trichoderma koningi* // Химия растительного сырья. 2001. №4. С. 69–72
4. Билай В.И., Билай Т.И., Мусич Е.Г. Трансформация целлюлозы грибами. Киев, 1982. 296 с.
5. Свистова И.Д., Бабьева Е.Н. Состав целлюлолитического комплекса некоторых микромицетов // Микология и фитопатология. 1986. Т. 20, вып. 2. С. 120–123.
6. Sadykova V.S., Rogozhin E.A., Kurakov A.V., Kuvarina A.E. Antimicrobial activity of fungi strains of *Trichoderma* from Middle Siberia // Applied Biochemistry and Microbiology. 2015. Vol. 51. N3. Pp. 355–361.
7. Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Абузярова Д.М. Биосинтез ксиланаз аборигенными изолятами *Trichoderma* // Вестник казанского технологического университета. 2005. №1. С. 251–255.
8. Soriente I., Ferraioli S., Woo S. et al. Integrated use of *Trichoderma harzianum* strains T22 and T39 with cell wall degrading enzymes to control plant diseases // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vienna, Austria, 2006.
9. Kurakov A.V., Khidirov K.S., Zvyagintsev D.G., Sadykova V.S. Anaerobic growth ability and alcohol fermentation activity of microscopic fungi // Applied Biochemistry and Microbiology. 2011. Vol. 47. N2. Pp. 169–175.

10. 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 целлюлигина торфа // Лесной журнал. 2016. №6. С. 142–152.
11. Алимova Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Казань, 2006. 209 с.
12. Мануковский Н.С. Кинетика биоконверсии лигноцеллюлоз. Новосибирск, 1990. 26 с.
13. Ташпулатов Ж.С., Байбаев Б.И. Биосинтез целлюлоз и белков при смешанном культивировании *Trichoderma harzianum* и *Sacharomyces cerevisia* // Узбекский биологический журнал. 1990. №4. С. 10–12.
14. Agosin E., Aguilera J.M. Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses // *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. Pp. 205–227.
15. Тиллаев Х.Т., Велицкая И.С. Способы приготовления различных форм биопрепарата триходермин и эффективность их действия против вилта хлопчатника // Микология и фитопатология. 1981. Т. 15, вып. 4. С. 317–321.
16. Федоринчик Н.С. Новый грибной биопрепарат Триходермин-4 для борьбы с болезнями растений // Сельскохозяйственная биология. 1977. Т. 12, вып. 1. С. 69–73.
17. Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Громовых В.С., Махова Е.Г. Эффективность действия *Trichoderma asperillum* (штамм МГ-97) на развитие фузариоза на сеянцах *Larix sibirica* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36, вып. 4. С. 70–75.
18. Sadycova V.S., Gromovykh T.I., Likhachev F.N., Kurakov A.V., Ushanova V.M. Biological activity of the Siberian *Trichoderma* strains as a factor for the development of new generation biopreparation // *Biotechnology in Russia*. 2007. №6. Pp. 10–18.
19. Литовка Ю.А., Громовых Т.И., Гукасян В.М. Влияние биоконтрольных штаммов *Trichoderma asperillum*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* на биологическую активность и структуру микробиоценоза почвы // Сибирский экологический журнал. 2002. №3. С. 371–376.
20. Лунёва Т.А., Ким Н.Ю., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Влияние грибов рода *Trichoderma* на углеводный комплекс коры лиственницы сибирской // Известия вузов. Химия и химическая технология. 2006. Т. 49, вып. 6. С. 88–91.
21. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Литовка Ю.А. Биоконверсия вегетативной части топинамбура микро- и макроскопическими грибами // Системы. Методы. Технологии. 2016. №1 (29). С. 147–151.
22. Гайдашева И.И., Садыкова В.С., Бондарь П.Н., Зобова Н.В., Громовых Т.И. Перспективы использования новых биопрепаратов для защиты злаков в Средней Сибири // Вестник КрасГАУ. 2008. №1. С. 74–78.
23. Исаева Е.В., Рязанов Т.В. Состав, свойства и переработка отходов вегетативной части тополя после извлечения экстрактивных веществ. Сообщение 1. Химический состав твердых и жидких отходов // Химия растительного сырья. 2012. №3. С. 59–65.
24. Исаев Е.В., Ложкина Г.А., Рязанова Т.В. Ферментация вегетативной части тополя грибами рода *Trichoderma* // Вестник КрасГАУ. 2006. №15. С. 219–222.
25. Исаева Е.В., Мамаева О.О., Рязанова Т.В. Биоконверсия опавших листьев тополя бальзамического мицелиальными грибами рода *Trichoderma* // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2017. №3. С. 382–389.
26. Lozhkina G.A., Isaeva E.V., Ryzanova T.V. A study of the alcohol extract from balsam poplar buds // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2010. Vol. 36. N7. Pp. 1–5.
27. Исаева Е.В., Ложкина Г.А., Литовка Ю.А., Рязанова Т.В. Биологическая активность экстрактов и эфирных масел почек тополя бальзамического Красноярского края // Химия растительного сырья. 2008. №1. С. 67–72.
28. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Исаева Е.В. Химия древесины. Saarbrücken, 2012. 428 с.
29. Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975. 322 с.
30. Исаева Е.В. Комплексная переработка вегетативной части тополя бальзамического с получением биологически активных продуктов: автореф. дисс. ... д-ра техн. наук. Красноярск, 2008. 43 с.
31. Махова Е.Г. Культивирование грибов рода на углеводных субстратах и получение биопрепарата: автореф. дисс. ... канд. техн. наук. Красноярск, 2003. 22 с.
32. Tankanen T.M. Characterization of esterases acting on hemicelluloses: Ph.D. Thes., techn.res. Centre of Finland. Helsinki, 1997. 94 p.

Поступила в редакцию 18 сентября 2020 г.

Принята к публикации 13 ноября 2020 г.

Для цитирования: Исаева Е.В., Мамаева О.О., Рязанова Т.В. Состав, свойства и переработка отходов вегетативной части тополя после извлечения экстрактивных веществ. Сообщение 3. Получение биопрепаратов на основе грибов рода *Trichoderma* // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 415–425. DOI: 10.14258/jcprm.2020048469.

*Isaeva E.V.**, *Mamaeva O.O.*, *Ryazanova T.V.* COMPOSITION, PROPERTIES AND RECYCLING OF VEGETATIVE POPLAR AFTER REMOVAL OF EXTRACTIVES. REPORT 3. OBTAINING BIOLOGICAL PRODUCTS BASED ON FUNGI OF THE GENUS *TRICHODERMA*

Siberian State University of Science and Technology named after academician M.F. Reshetnev, pr. Mira, 82, Krasnoyarsk, 660037 (Russia), e-mail: isaevaelena08@mail.ru

The purpose of this work was to assess the suitability of solid and liquid waste generated during processing of the vegetative part of poplar as substrates for biochemical processing in order to obtain biologics for various purposes. For the study, we used post-extraction residues, as well as a cubic liquid formed after distilling essential oils and extracting alcohol-soluble substances from the vegetative part of the balsamic poplar (*Populus balsamifera* L.). Siberian strains of fungi of the genus *Trichoderma* used as a biodestructor.

Studies have shown that the vegetative part of poplar and its individual elements are an available substrate for the growth of mycelial fungi. The high yield of spores (4.5×10^9 spor/g) and the formation of humic substances (11%) used as plant growth stimulators during solid-phase cultivation of the MG-97 strain of *Trichoderma* fungi gives grounds to use the vegetative part of poplar as a technological raw material for obtaining a biological product of the "Trichodermin" type or soil humification. Depending on the purpose of the preparations, the duration of cultivation can vary: for obtaining agricultural biologics up to 15 days, more – for soil humification. The inclusion of a cubic liquid at the stage of substrate humidification allows to obtain a biological product with a higher spore titer (5×10^9 spor/g), makes it possible to close the water consumption cycle and make the technology of processing the vegetative part of poplar waste-free.

Keywords: a poplar, a vegetative part, solid-phase cultivation, biological product.

References

1. Ripachek V.I. *Biologiya derevorazrushayushchikh gribov*. [Biology of wood-destroying fungi]. Moscow, 1967, 276 p. (in Russ.).
2. Skryabin G.K. *Mikologiya i fitopatologiya*, 1986, no. 5, pp. 976–983. (in Russ.).
3. Makhova Ye.G., Ryazanova T.V., Chuprova N.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2001, no. 4, pp. 69–72. (in Russ.).
4. Bilay V.I., Bilay T.I., Musich Ye.G. *Transformatsiya tsellyulozy griбами*. [Transformation of cellulose by fungi]. Kiev, 1982, 296 p. (in Russ.).
5. Svistova I.D., Bab'yeva Ye.N. *Mikologiya i fitopatologiya*. 1986, vol. 20, no. 2, pp. 120–123. (in Russ.).
6. Sadykova V.S., Rogozhin E.A., Kurakov A.V., Kuvarina A.E. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 355–361.
7. Skvortsov Ye.V., Alimova F.K., Abuzyarova D.M. *Vestnik kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2005, no. 1, pp. 251–255. (in Russ.).
8. Soriente I., Ferraioli S., Woo S. at. al. *9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium*, Vienna, Austria, 2006.
9. Kurakov A.V., Khidirov K.S., Zvyagintsev D.G., Sadykova V.S. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, vol. 47, no. 2, pp. 169–175.
10. Gavrillov S.V., Kanarskiy A.V., Skvortsov Ye.V., Sevast'yanova Yu.V. *Lesnoy zhurnal*, 2016, no. 6, pp. 142–152. (in Russ.).
11. Alimova F.K. *Promyshlennoye primeneniye gribov roda Trichoderma*. [Industrial use of fungi of the genus *Trichoderma*]. Kazan', 2006, 209 p. (in Russ.).
12. Manukovskiy N.S. *Kinetika biokonversii lignotsellyuloz*. [Kinetics of lignocellulose bioconversion]. Novosibirsk, 1990. 26 p. (in Russ.).
13. Tashpulatov Zh.S., Baybayev B.I. *Uzbekskiy biologicheskiy zhurnal*, 1990, no. 4, pp. 10–12. (in Russ.).
14. Agosin E., Aguilera J.M. *Trichoderma and Gliocladium. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application*. London: Taylor and Francis Ltd., 1998, pp. 205–227.
15. Tillayev Kh.T., Velitskaya I.S. *Mikologiya i fitopatologiya*, 1981, vol. 15, no. 4, pp. 317–321. (in Russ.).
16. Fedorinchik N.S. *Sel'sko-khozyaystvennaya biologiya*, 1977, vol. 12, no. 1, pp. 69–73. (in Russ.).
17. Gromovykh T.I., Litovka Yu.A., Gromovykh B.C., Makhova Ye.G. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2002, vol. 36, no. 4, pp. 70–75. (in Russ.).
18. Sadykova V.S., Gromovykh T.I., Likhachev F.N., Kurakov A.V., Ushanova V.M. *Biotechnology in Russia*, 2007, no. 6, pp. 10–18.
19. Litovka Yu.A., Gromovykh T.I., Gukasyan V.M. *Sibirskiy ekologicheskiy zhurnal*, 2002, no. 3, pp. 371–376. (in Russ.).
20. Lunova T.A., Kim N.Yu., Ryazanova T.V., Chuprova N.A. *Izvestiya vuzov. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya*, 2006, vol. 49, no. 6, pp. 88–91. (in Russ.).
21. Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Litovka Yu.A. *Sistemy. Metody. Tekhnologii*, 2016, no. 1 (29), pp. 147–151. (in Russ.).
22. Gaydasheva I.I., Sadykova V.S., Bondar' P.N., Zobova N.V., Gromovykh T.I. *Vestnik KrasGAU*, 2008, no. 1, pp. 74–78. (in Russ.).
23. Isayeva Ye.V., Ryazanov T.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2012, no. 3, pp. 59–65. (in Russ.).
24. Isayev Ye.V., Lozhkina G.A., Ryazanova T.V. *Vestnik KrasGAU*, 2006, no. 15, pp. 219–222. (in Russ.).

* Corresponding author.

25. Isayeva Ye.V., Mamayeva O.O., Ryazanova T.V. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya*, 2017, no. 3, pp. 382–389. (in Russ.).
26. Lozhkina G.A., Isaeva E.V., Ryazanova T.V. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2010, vol. 36, no. 7, pp. 1–5.
27. Isayeva Ye.V., Lozhkina G.A., Litovka Yu.A., Ryazanova T.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2008, no. 1, pp. 67–72. (in Russ.).
28. Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Isayeva Ye.V. *Khimiya drevesiny*. [Wood chemistry]. Saarbrücken, 2012, 428 p. (in Russ.).
29. Keyts M. *Tekhnika lipidologii*. [Technique of lipidology]. Moscow, 1975, 322 p. (in Russ.).
30. Isayeva Ye.V. *Kompleksnaya pererabotka vegetativnoy chasti topolya bal'zamicheskogo s polucheniyem biologicheski aktivnykh produktov: avtoref. diss. ... d-ra tekhn. nauk*. [Complex processing of the vegetative part of the balsam poplar to obtain biologically active products: abstract diss. ... Dr. Tech. sciences]. Krasnoyarsk, 2008, 43 p. (in Russ.).
31. Makhova Ye.G. *Kul'tivirovaniye gribov roda na uglevodnykh substratakh i polucheniye biopreparata: avtoref. diss. ... kand. tekhn. nauk*. [cultivation of fungi of the genus on carbohydrate substrates and obtaining a biological product: author. diss. ... Cand. tech. sciences]. Krasnoyarsk, 2003, 22 p. (in Russ.).
32. Tankanen T.M. *Characterization of esterases acting on hemicelluloses: Ph.D. Thes., techn.res.* Centre of Finland. Helsinki, 1997. 94 p.

Received September 18, 2020

Accepted November 13, 2020

For citing: Isaeva E.V., Mamaeva O.O., Ryazanova T.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 415–425. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020048469.

