

Є.О. ОМЕЛЬЧУК, асп.
В.О. КРАСІНЬКО, канд. техн. наук
О.О. ІВАНОВ, студент
І.О. ТВЕРДОХЛІБ, асист.
Національний університет харчових технологій, м. Київ
А.П. КАПІЧОН, інженер
В.Л. АЙЗЕНБЕРГ, канд. біол. наук
В.І. СТОЙКО, провідний інженер
Інститут мікробіології і вірусології НАН України, м. Київ

СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ СЕРЕД МЕЗОФІЛЬНИХ ТА ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ МІКРОМІЦЕТІВ

Здійснено багатоступеневий скринінг серед штамів мезофільних та термотолерантних мікроміцетів на здатність їх до синтезу спектру целюлолітичних ферментів. Для подальшого дослідження відібрано найбільш активні штами.

Ключові слова: скринінг, целюлази, ендоглюканаза, мезофільні мікроміцети, термотолерантні мікроміцети

Осуществлён многоступенчатый скрининг среди штаммов мезофильных и термофильных микромицетов по их способности к синтезу целлюлолитических ферментов. Для дальнейшего исследования отобраны наиболее активные штаммы.

Ключевые слова: скрининг, целлюлазы, эндоглюканаза, мезофильные микромицеты, термотолерантные микромицеты

The multistep screening amid the mesophilous and termotolerance micromicetes for synthetic ability of cellulolytic enzyme complex was realized. The most active stains was selected for further research.

Keywords: screening, cellulases, endoglucanase, mesophilous micromicetes, termotolerance micromicetes

Загальні запаси рослинної біомаси, яка в основному складається з целюлози, на Землі оцінюються у $7,2 \cdot 10^{11}$ т [1] (для порівняння – запаси невідновлювальних природних джерел енергосиїв (нафти і газу) складають 900 млрд т), причому щорічно в результаті фіксації сонячної енергії утворюється приблизно $4 \cdot 10^{10}$ т біомаси, а також накопичується біля $5 \cdot 10^9$ т відходів або вторинних продуктів промислової та сільськогосподарської переробки рослин та деревини і відходів харчової промисловості рослинного походження [2].

У той же час серйозною перешкодою для широкого використання рослинної целюлозовмісної сировини є її нерозчинність, відсутність дешевої та доступної технології утилізації целюлозовмісних сполук.

Шляхом вирішення даної проблеми може стати розроблення технології ферментативного гідролізу рослинних відходів. Однак на сьогоднішній день розроблення подібних технологій гальмується важкодоступністю ферментних систем до молекули целюлози, а також занадто низькою

активністю та дороговизною отримання ферментних целюлозолітичних препаратів.

Тому важливою задачею є створення дешевого ферментного препарату із високою загальною целюлолітичною активністю, стабільного у широкому діапазоні значень рН та температури.

Об'єктами дослідження були колекційні штами різних видів мікроскопічних грибів із Української колекції мікроміцетів, виділені із різноманітних субстратів природного та антропогенного походження. Загалом у дослідженні було використано 138 штамів 44 видів 23 родів мікроміцетів.

Перелік родів мезофільних та термотолерантних мікроміцетів, яких перевіряли на здатність до росту на целюлозовмісному субстраті, вказаний у таблицях 1 та 2.

Відбір активних продуцентів целюлолітичних ферментів здійснювався у два етапи.

На першому етапі досліджували здатність мікроміцетів до росту на целюлозовмісному субстраті, а саме фільтрувальному папері (вміст целюлози — 97 – 98 %). Для цього здійснювали культивування

мікроміцетів на мінеральному поживному середовищі Чапека за Підоплічко. Культивування здійснювали у стаціонарних умовах за температури 28 °C та 42 °C для мезофільних та термотолерантних мікроміцетів відповідно протягом 21 доби.

Таблиця 1
Досліджувані мезофільні мікроміцети

| № пор | Рід | Кількість досліджуваних видів (штамів) мікроміцетів |
|-------|----------------------|---|
| 1 | <i>Ascremonium</i> | 1 (2) |
| 2 | <i>Aspergillus</i> | 4 (10) |
| 3 | <i>Cladosporium</i> | 2 (3) |
| 4 | <i>Cochliobolus</i> | 1 (1) |
| 5 | <i>Fusarium</i> | 9 (38) |
| 6 | <i>Gliocladium</i> | 1 (3) |
| 7 | <i>Humicola</i> | 1 (2) |
| 8 | <i>Mycelia</i> | 1 (1) |
| 9 | <i>Oidiodendron</i> | 1 (1) |
| 10 | <i>Rhizopus</i> | 3 (4) |
| 11 | <i>Trichocladium</i> | 1 (1) |
| 12 | <i>Verticillium</i> | 1 (1) |

Таблиця 2
Досліджувані термотолерантні мікроміцети

| № пор | Рід | Кількість досліджуваних видів (штамів) мікроміцетів |
|-------|----------------------|---|
| 1 | <i>Aspergillus</i> | 3 (3) |
| 2 | <i>Chaetomium</i> | 1 (3) |
| 3 | <i>Chrysosporium</i> | 1 (2) |
| 4 | <i>Corynascus</i> | 1 (9) |
| 5 | <i>Emericella</i> | 1 (2) |
| 6 | <i>Malbranchea</i> | 2 (8) |
| 7 | <i>Melanocarpus</i> | 1 (4) |
| 8 | <i>Rhizomucor</i> | 2 (9) |
| 9 | <i>Talaromyces</i> | 2 (7) |
| 10 | <i>Thielavia</i> | 1 (7) |
| 11 | <i>Teramoascus</i> | 3 (15) |

Оцінку інтенсивності росту в балах здійснювали кожних 7 діб за методикою, запропонованою Т.І. Білаєм [3]. Оцінювали за такими критеріями: інтенсивність росту, наявність спороношення, виникнення просвітлень чи розривів на фільтрувальному папері.

Характеристику здатності мікроміцетів різних таксономічних груп до росту на целюлозовмісному субстраті наведено на рис. 1.

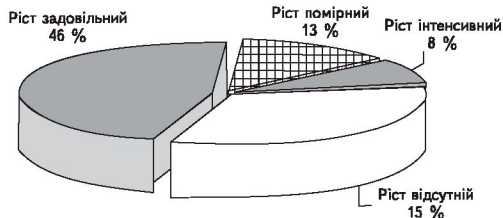


Рис. 1. Здатність мікроміцетів різних таксономічних груп до росту на фільтрувальному папері

З діаграми видно, що до помірного та інтенсивного росту на фільтрувальному папері з дослідже-

них мікроміцетів здатні 21 % досліджуваних штамів; 46 % мікроміцетів неінтенсивно ростуть на целюлозовмісному субстраті, тобто оцінені згідно методики на 2 – 3 бали; 15 % досліджуваних штамів були нездатними до росту на целюлозовмісному субстраті.

Для порівняльної характеристики мезофільних та термотолерантних мікроміцетів за здатністю до росту на целюлозовмісному субстраті була побудована діаграма, що представлена на рис. 2.

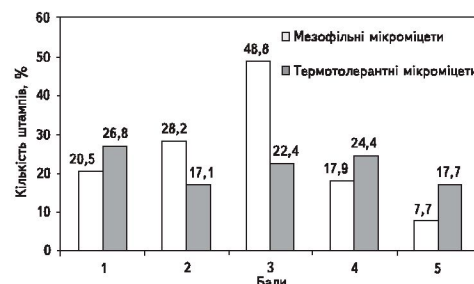


Рис. 2. Розподіл мезофільних та термотолерантних мікроміцетів за здатністю до росту на целюлозовмісному субстраті

З діаграми видно, що термотолерантні мікроміцети більшу інтенсивність росту на целюлозовмісному субстраті (фільтрувальному папері), ніж мезофільні, оскільки на 4 бали за інтенсивністю росту термотолерантних штамів оцінено на 6,5 % більше, ніж мезофільних, а на 5 балів — на 9,4 % більше. На 20,4 % більше мезофільних мікроміцетів, ріст яких оцінений як задовільний (3 бали) та на 11,1 % мезофілів більше, ріст яких оцінено на 2 бали. Лише на 1,2 % більше термотолерантних мікроміцетів, які не здатні до росту на целюлозовмісному субстраті.

Спостереження за ростом мікроміцетів дали змогу відмітити такі особливості:

1. Розбіжність в інтенсивності росту та ступені руйнування паперу грибами проявлялися на видовому та штамовому рівнях.

2. Майже для всіх ізолятів найактивніший ріст спостерігався на розділі рідкої та газоподібної фаз.

Характер росту штамів грибів родів *Aspergillus* і *Penicillium* був схожим і проявлявся у наступному: добре помітне щільне матове або біле кільце на межі розділу фаз, незначний глибинний ріст та активний ріст на частині паперу, не зануреній у середовище.

Активні штами роду *Fusarium* відрізнялися від представників інших родів утворенням значних за площею ділянок охоплення міцелієм зразків паперу, рівномірним ростом на повітряній частині зразка паперу та слабким глибинним ростом.

Термотолерантні мікроміцети *Rhizomucor pusillus* (8 штамів) та *Thermoascus aurantiacus* (7 штамів) не ростуть на середовищі з фільтрувальним папером, тому представники саме цих видів обумовили високий відсоток серед термотолерантних мікроміцетів, ріст яких був оцінений на 1 бал.

Серед досліджуваних культур були відібрані 6 штамів грибів з високою швидкістю росту у яких зафіксовані: інтенсивний та добре розвинутий міцелій, що огортає целюлозовмісний субстрат, руйнування фільтрувального паперу. Так у *Thielavia sp.* 1915 260 відмічений інтенсивний ріст міцелію вже на 7-му добу. Штами *Corynascus sp.* 68 ТВТ та *Thielavia sp.* 52 помітно руйнують фільтрувальний папір на 14-ту добу росту. Майже усі представники роду *Thielavia* інтенсивно ростуть на фільтрувальному папері, але не розкладають чи просвітлюють фільтрувальний папір, це може свідчити, що даний рід мікроміцетів здатен до синтезу целюлолітичних екзоферментів за способом дії. Наopak, серед представників роду *Corynascus* спостерігали менш інтенсивний ріст, але дуже часто були відзначені просвітлення і навіть розриви фільтрувального паперу.

Також спостерігали значне зменшення об'єму культуральної рідини та поява повітряних бульбашок в товщі міцелію при культивуванні деяких представників роду *Thielavia*. За культивування *Thielavia sp.* 52 спостерігали забарвлення культуральної рідини у жовтий колір.

Для подальших досліджень відбирали штами, у яких спостерігали як інтенсивний, так і помірний ріст на фільтрувальному папері, оскільки мікроміцети, які навіть не утворюють густого міцелію, можуть інтенсивно синтезувати целюлолітичні ферменти [3].

Отже, в результаті першого етапу скринінгу було відібрано 11 штамів мезофільних мікроміцетів та 20 штамів термотолерантних мікроміцетів, які належать до родів *Aspergillus* (2 штами), *Chaetomium* (1 штама), *Chrysosporium* (2 штами), *Coprinus* (1 штама), *Corynascus* (6 штамів), *Fusarium* (8 штамів), *Humicola* (1 штама), *Emericella* (2 штами), *Melanocarpus* (1 штама), *Penicillium* (1 штама), *Thielavia* (5 штамів) та *Verticillium* (1 штама).

На другому етапі скринінгу відібрані мікроміцети культивували у пробірках на качалці (частота обертання 200 об/хв) протягом 4 та 6 діб за аналогічних значень температури. Культивування здійснювали на поживному середовищі із аналогічним мінеральним складом та подрібненим на млині целюлозовмісним субстратом (фільтрувальний папір).

На даному етапі здійснювали визначення Сх-ферментів (ендоглюканази), що продукуються відібраними мікроміцетами. Методика базується на визначенні зміни в'язкості натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) у результаті дії целюлолітичних ферментів. Вимірювання в'язкості здійснювали за допомогою віскозиметра Оствальда. Активність Сх-ферменту виражали у відсотках падіння в'язкості розчину Na-КМЦ під дією ферменту [3].

Критерієм відбору активних продуцентів ферментів целюлазного комплексу було зниження в'яз-

кості розчину Na-КМЦ на 20% незалежно від терміну досягнення даної величини (4-та або 6-та доба культивування).

Результати досліджень наведено у таб. 3.

З даних досліджень видно, що максимум ферментативної активності як серед мезофільних, так і серед термотолерантних мікроміцетів (біля 80%), припадає на 6-ту добу культивування. Інші 20% належать до мікроміцетів, здатних до швидкого росту та синтезу целюлаз, серед яких лише один мікроміцет належить до мезофілів, а 5 — до термотолерантних мікроорганізмів.

Таблиця 3

Сх-активність відібраних мезофільних та термотолерантних мікроміцетів на 4-ту та 6-ту добу культивування

| № п/п | Штам мікроміцета | Зниження в'язкості розчину Na-КМЦ, % | |
|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------|
| | | IV доба | VI доба |
| Мезофільні мікроміцети | | | |
| 1 | <i>Fusarium avenaceum</i> 50431 | 5,21 | 6,84 |
| 2 | <i>Fusarium avenaceum</i> 52336 | 12,28 | 16,87 |
| 3 | <i>Fusarium avenaceum</i> 54809 | 2,94 | 3,85 |
| 4 | <i>Fusarium avenaceum</i> 55409 | 5,75 | 10,38 |
| 5 | <i>Fusarium avenaceum</i> 55526 | 16,82 | 17,00 |
| 6 | <i>Fusarium avenaceum</i> 55854 | 2,61 | 2,45 |
| 7 | <i>Fusarium solani</i> 53400 | 24,38 | 22,31 |
| 8 | <i>Fusarium sambucinum</i> 54991 | 4,29 | 9,16 |
| 9 | <i>Humicola grisea</i> 3200 | 10,03 | 10,62 |
| 10 | <i>Penicillium sp.</i> 225 | 4,63 | 29,30 |
| 11 | <i>Verticillium lateritium</i> 94 | 8,73 | 17,13 |
| Термотолерантні мікроміцети | | | |
| 12 | <i>Aspergillus sp.</i> 1957 | 34,57 | 36,78 |
| 13 | <i>Aspergillus sp.</i> 262 | 43,43 | 43,85 |
| 14 | <i>Corynascus sp.</i> 62063 | 13,18 | 18,87 |
| 15 | <i>Corynascus sp.</i> 62065 | 15,66 | 28,49 |
| 16 | <i>Corynascus sp.</i> F-62364 | 1,01 | 2,78 |
| 17 | <i>Corynascus sp.</i> 65068 | 5,64 | 29,00 |
| 18 | <i>Corynascus sp.</i> 65102 | 21,75 | 30,44 |
| 19 | <i>Corynascus sp.</i> 68 ТВТ 1899 | 39,04 | 37,14 |
| 20 | <i>Corynascus sp.</i> 8 ТСАХ | 21,31 | 20,96 |
| 21 | <i>Chrysosporium termophilus</i> 1918 | 7,48 | 5,51 |
| 22 | <i>Chaetomium sp.</i> 1963 | 10,89 | 16,64 |
| 23 | <i>Coprinus delicatus</i> 1962 | 5,59 | 4,03 |
| 24 | <i>Emericella nidulans</i> 102 ГВТ | 3,85 | 3,98 |
| 25 | <i>Emericella nidulans</i> 418 | 13,91 | 23,57 |
| 26 | <i>Melanocarpus albomyces</i> 62164 | 8,59 | 6,09 |
| 27 | <i>Thielavia sp.</i> 52 | 20,06 | 23,47 |
| 28 | <i>Thielavia sp.</i> 620 | 18,23 | 22,12 |
| 29 | <i>Thielavia sp.</i> 08.64.1996 | 8,95 | 12,78 |
| 30 | <i>Thielavia sp.</i> 85 ТРМ | 4,99 | 8,57 |
| 31 | <i>Thielavia sp.</i> 1915 260 | 12,84 | 13,70 |

Була помічена чітка кореляція швидкості синтезу целюлолітичних ферментів від штамової приналежності гриба. Вийнятками у даному випадку є роди *Corynascus* та *Thielavia*, серед яких є штами, максимум целюлолітичної активності у яких може припадати як на 4-ту, так і на 6-ту добу культивування.

В результаті другого ступеня скринінгу було відібрано 10 штамів мікроміцетів, серед яких 2 штами належать до мезофільних мікроміцетів, а 10 — до термотолерантних.

Висновки. На підставі проведених досліджень виявлено, що досліджувані термотолерантні мікроміцети мають кращу інтенсивність росту на целюлозовмісному субстраті, ніж мезофільні.

У результаті першого етапу скринінгу було відібрано 11 мезофільних та 20 термотолерантних штамів мікроміцетів, які характеризувались інтенсивним та помірним ростом на фільтрувальному папері.

Після другого етапу скринінгу для подальших досліджень відібрано 2 мезофільних мікроміцета роду

Fusarium та *Penicillium*, а також 10 термотолерантних мікроміцетів, серед яких: 2 представники роду *Aspergillus*; 5 представників роду *Corynascus*; 3 представники роду *Thielavia*; 1 представник роду *Emericella*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lynd L. R., van Zyl W. H., McBride J. E., Laser M. // Curr. Opin. Biotechnol. — 2005. — 16. — P. 577 – 583.
2. Рабинович М.Л. Производство этанола из целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикладная биохимия и микробиология — 2006 — Т.42 — №1 — С. 5 – 32.
3. Методы экспериментальной микологии: Справочник. — К.: Наукова думка, 1982. — 550 с.