

ПОИСК ГРИБНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**И.В. Мороз, Р.В. Михайлова, Е.В. Шахнович, А.Г. Лобанок***Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск,
Республика Беларусь, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by***Введение**

В настоящее время целлюлолитические ферменты являются одной из наиболее значимых групп промышленных гидролитических ферментов. Это обусловлено постоянно расширяющейся сферой их практического применения в сельском хозяйстве, различных отраслях промышленности (пищевой, текстильной, деревообрабатывающей, фармацевтической), производстве кормов, биоэтанола, моющих средств, а также технологиях переработки различных отходов [1–7].

Из аспектов практического использования целлюлаз особо следует выделить кормопроизводство, так как обеспеченность высококачественными комбикормами лежит в основе развития животноводства и птицеводства – важных секторов агропромышленного комплекса. Применение целлюлолитических ферментов в кормах обеспечивает повышение питательной ценности рационов, снижение расхода кормов на единицу продукции, повышение продуктивности животных и птицы [5, 6].

В связи с тем, что в Беларуси отсутствует производство ферментного препарата целлюлолитического действия, в производстве кормов используются импортные ферментные препараты. Поэтому актуальной и значимой является разработка биотехнологии производства отечественного целлюлолитического препарата, основанная на использовании микроорганизмов – высокоактивных продуцентов фермента.

Цель настоящей работы – поиск новых высокоактивных грибных продуцентов целлюлолитических ферментов.

Методы исследования

В качестве объектов исследования использовали 97 грибных штаммов, из них – 44 природных изолята и 53 коллекционных штамма из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси и из коллекции MSK-F Национального гербария Института экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси.

Изоляты грибов выделяли из различных природных объектов (почв, растительных остатков и т.д.) методами почвенных разведений или накопительных культур [8–9]. Идентификацию выделенных грибов до рода (29 культур) проводили на основании результатов, полученных при анализе макро, микроморфологических признаков, морфологических особенностей конидиального спороношения исследуемой культуры, и сопоставлении с таковыми, представленными в определителях [10–12].

Отбор штаммов штаммов-продуцентов проводили в два этапа. На первом этапе использовали качественный (чашечный) метод, предусматривающий выращивание культур на агаризованных селективных питательных средах. Тестируемые грибы выращивали в чашках Петри в течение 4–7 сут на модифицированных средах Чапека-Докса, содержащих в качестве источника углерода и субстрата для ферментов натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ, 0,05–1,0%). В качестве индикаторов использовали конго красный (0,01–0,5 %, вводили в агаризованную среду), а также раствор Люголя или йодистый раствор по Граму (водный раствор йода в KI, использовали для окрашивания). Культуры, синтезирующие целлюлазы, выявляли по способности формировать зоны просветления (изменения окраски) вокруг колоний, целлюлазную активность оценивали по величине соотношения диаметра зон просветления ($d_{\text{зоны}}$) и диаметра колоний ($d_{\text{колонии}}$).

Глубинное культивирование грибов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (180–200 об/мин) при 26–30°C в течение 4–7 сут. Питательная среда содержала (г/л): свекловичный жом – 20,0; солодовые ростки – 5,0; пшеничные отруби – 5,0; NH_4NO_3 (среда № 1) или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (среда № 2) – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01. Исходный pH питательной среды – 4,5.

Грибы поддерживали на агаре Чапека с полоской фильтровальной бумаги, служащей источником углерода. В качестве посевного материала использовали водную споровую суспензию, полученную после роста грибов на поддерживающей среде в течение 14 сут при 24–26 °С. По окончании культивирования биомассу отделяли фильтрованием, фильтрат культуральной жидкости использовали для анализов.

Для определения целлюлазной активности использовали калориметрический метод, основанный на определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии ферментов целлюлолитического комплекса на субстрат – Na-КМЦ [13]. Реакцию гидролиза проводили при 40°C в течение 20 мин. За единицу активности принимали такое количество фермента, при действии которого на Na-КМЦ за минуту образуется 1 микромоль восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу. Для определения содержания восстанавливающих сахаров применяли 3,5-динитросалициловую кислоту [14, 15].

Приведенные в работе результаты экспериментов представляют собой усредненные величины 3–5 опытов. При статистической обработке полученных данных использовали компьютерную программу Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

В литературе представлены экспресс-методы отбора микроорганизмов-продуцентов целлюлолитических ферментов, основанные на формировании комплексов между полисахаридами и красителями. Наиболее часто способность к деградации целлюлозы оценивают по способности микроорганизмов расти и формировать зоны просветления вокруг колоний на агаризованной минеральной среде с использованием субстрата КМЦ и хромогенного красителя конго красного [16–19]. В качестве индикатора используют также раствор Люголя [20–21]. При наличии у тестируемых микроорганизмов способности продуцировать целлюлолитические ферменты, которые диффундируют в агар и гидролизуют Na-КМЦ, окрашенная агаризованная питательная среда вокруг выросших грибных колоний обесцвечивается.

С помощью вышеуказанного экспресс-метода проанализирована способность 97 грибных штаммов синтезировать целлюлолитические ферменты. Наличие способности продуцировать целлюлазы выявлено у 31 культуры, из которых 11 штаммов относились к роду *Aspergillus*, 13 – *Penicillium*, 5 – *Trichoderma*, 2 – *Alternaria*. Отношения диаметров зон просветления и диаметров колоний составили: 1,02–1,30 (индикатор конго красный) и 1,01–2,06 (окрашивание раствором Люголя в течение 5 мин). Наиболее активные штаммы отбирали по максимальным значениям отношения $d_{\text{зоны}} / d_{\text{колонии}}$, полученным для грибов, выросших на 2-х средах (таблица 1).

Таблица 1 – Отобранные мицелиальные грибы – продуценты целлюлолитических ферментов

Культура	$d_{\text{зоны}} / d_{\text{колонии}}$ (индикатор Конго красный)	$d_{\text{зоны}} / d_{\text{колонии}}$ (индикатор раствор Люголя)
<i>Aspergillus sp.</i> 3	1,30±0,05	2,06±0,06
<i>Penicillium sp.</i> 8	1,24±0,04	1,36±0,05
<i>Trichoderma atroviride</i>	1,28±0,05	1,89±0,06
<i>P. canescens</i> F-20310	1,24±0,03	1,45±0,04
<i>Tr. viride</i> F3	1,29±0,05	2,01±0,06
<i>Tr. viride</i> F-284	1,28±0,05	1,93±0,06

На втором этапе отбора у штаммов *Aspergillus sp.* 3, *Penicillium sp.* 8, *P. canescens* F-20310, *Trichoderma atroviride*, *Tr. viride* F3 и *Tr. viride* F-284 проводили количественную оценку уровня продуцирования внеклеточных целлюлаз при глубинном культивировании в колбах на качалке.

Для этого был подобран состав жидкой питательной среды. Исходная среда для глубинного культивирования отобранных штаммов имела солевой состав, аналогичный составу среды Чапека. Изучали влияние различных источников углерода, азота, фосфора, факторов роста, а также их комбинаций на биосинтез целлюлаз отобранными штаммами. В среду добавляли следующие компоненты: свекловичный жом, фильтровальная бумага, NaКМЦ – 5,0–20,0 г/л; пшеничные отруби, солодовые ростки – 2,0–5,0 г/л; кукурузный экстракт и экстракт солодовых ростков – 5,0–20 мл/л; глюкоза – 0,5 г/л; лактоза – 2,0–4,0 г/л; нитрат аммония, натрий азотнокислый, аммоний серноокислый – 0,4–1,0 г/л; дигидрофосфат калия – 1,0–3,0 г/л. Исследование показало, что оптимальные условия для образования целлюлаз тестируемыми грибами создаются при культивировании в среде, содержащей в качестве источника углерода свекловичный жом совместно с пшеничными отрубями и

солодовыми ростками, азота – нитрат аммония (среда № 1) или сернокислый аммоний (среда № 2), фосфора – дигидрофосфат калия. Уровень синтеза целлюлаз отобранными культурами в данном случае составил 0,21–0,53 ед/мл (таблица 2). Максимальным уровнем продукции целлюлолитических ферментов характеризовались *Trichoderma atroviride* и *Tr. viride* F-3 – 0,41–0,53 ед/мл.

Таблица 2 – Образование целлюлолитических ферментов отобранными грибами при глубинном культивировании

Культура	Целлюлаза, ед/мл	
	среда № 1	Среда № 2
<i>Aspergillus sp.</i> 3	0,23±0,01	0,21±0,01
<i>Penicillium sp.</i> 8	0,23±0,01	0,24±0,01
<i>P. canescens</i> F-20310	0,28±0,01	0,21±0,01
<i>Trichoderma atroviride</i>	0,53±0,03	0,46±0,03
<i>Tr. viride</i> F-3.	0,41±0,03	0,47±0,02
<i>Tr. viride</i> F-284	0,33±0,02	0,29±0,01

Выводы

В результате проведенного двухэтапного скрининга продуцентов целлюлолитических ферментов среди коллекционных (53 штамма) и выделенных из природной среды (44 штамма) грибных культур отобраны *Trichoderma viride* F-3 и *Trichoderma atroviride*. Как наиболее активные и перспективные продуценты указанных ферментов, отобранные штаммы могут быть использованы для создания отечественной биотехнологии получения ферментного препарата для кормопроизводства.

Список литературы

1. Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology / M.K. Bhat // Biotechnol. Adv. – 2000. – Vol. 18, № 5. – P. 355–383.
2. Karmakar, M. Current trends in research and application of microbial cellulases / M. Karmakar, R.R. Ray // Research J. Microbiology. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 41–53.
3. Переволоцкая, В.К. Применения в льноотделочном производстве фермента Целловиридина Г2Х / В.К. Переволоцкая, В.А. Афанасьева, Л.А. Головина // Рос. хим. журн. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева) – 2002. – Т. XLVI, № 2. – С. 52–55.
4. Bajpai, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry / P. Bajpai // Biotechnol. Prog. – 1999. – Vol. 15. – P. 147–157.
5. Murad, H.A. Cellulase and dairy animal feeding / H.A. Murad, H.H. Azzaz // Biotechnol. – 2010. – Vol. 9, № 3. – P. 238–256.
6. Телишевская, Л.Я. Ферментные препараты в кормопроизводстве / Л.Я. Телишевская, А.А. Комаров, Ю.В. Болденко // Вестн. биотехнол. и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2005. – Т. 1, № 2. – С. 63–67.
7. Okeke, B.C. Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases / B.C. Okeke, S.K.C. Obi // Biores. Technol. – 1995. – Vol. 51. – P. 23–27.
8. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай [и др.]; под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1973. – 242 с.
9. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. уч. заведений / А.И. Нетрусов [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
10. Pitt, J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces* / J.I. Pitt. – L-N.Y.: Acad. Press, 1979. – 633 p.
11. Билай, Т.И. Определитель термофильных грибов / Т.И. Билай, В.А. Захарченко. – Киев: Наукова думка, 1987. – 112 с.
12. Билай, В.И. Определитель токсино-образующих микромицетов / В.И. Билай, З.А. Курбацкая. – Киев: Наукова думка, 1990. – 223 с.
13. Препараты ферментные. Методика выполнения измерений β-глюкоканазной, ксиланазной, целлюлазной активностей: МВИ.МН 3235–2009. – Введ. 30.09.09. – Минск: РУП «Бел. гос. ин-т метрологии», 2009. – 36 с.
14. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // Anal. Chem. – 1959. – Vol. 31, №3. – P. 426–428.
15. Somogyi, M. A new reagent for the determination of sugars / M. Somogyi // J. Biol. Chem. – 1945. – Vol. 160, № 1. – P. 61–68.
16. Teather, R.M. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen / R.M. Teather, P.J. Wood // Appl. Environ. Microbiol. – 1982. – Vol. 43. – P. 777–780.
17. Doolotkeldieva, T.D. Screening of Wild-Type Fungal Isolates for Cellulolytic Activity / T.D. Doolotkeldieva, S.T. Bobusheva // Microbiology Insights. – 2011. – Vol. 4. – P. 1–10.
18. Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch / N.K. Abu Bakar [et al.] // Biotechnol. – 2010. – Vol. 9, № 1. – P. 73–78.
19. Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil / A.S. Lakshmi, G. Narasimha // Annals of Forest Research. – 2012. – Vol. 55, № 1. – P. 85–92.
20. Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin / R.C. Kasana [et al.] // Curr. Microbiol. – 2007. – Vol. 54, № 6. – P. 457–461.
21. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine / R.S. Kasana [et al.] // Microbiol. – 2008. – Vol. 57, № 5. – P. 503–507.