УДК 579.61:577.15
DOI: 10.29296/25877313-2018-03-05
© З.К. Никитина, И.К. Гордонова, 2018

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОИСКА ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ

З.К. Никитина
д.б.н., профессор, гл. науч. сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: nikitinaz@yandex.ru
И.К. Гордонова
к.б.н., вед. науч. сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

В целях разработки методических подходов для селекции микромицетов с целлюлазной активностью исследованы параметры роста шести микромицетов при культивировании на средах, содержащих различные источники целлюлозы. Выявлены два штамма, наиболее перспективных в качестве потенциальных продуцентов целлюлаз.

Ключевые слова: *микромицеты, целлюлоза, целлюлаза.*

Для цитирования: Никитина З.К., Гордонова И.К. Разработка методических подходов для поиска продуцентов целлюлаз. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(3):27–31. **DOI: 10.29296/25877313-2018-03-05**

Лигноцеллюлозная биомасса является потенциальным источником дешевого сырья для получения разнообразных продуктов и топлива, в частности этанола [1]. Ежегодно в результате фиксации солнечной энергии образуется приблизительно 4×10^{11} т растительной биомассы, состоящей в основном из целлюлозы [2, 3]. В процессе конверсии целлюлозы этапом, сдерживающим внедрение технологии в производство, является ферментативный гидролиз целлюлозы до глюкозы, осуществляемый различными целлюлазами. Эти ферменты, принадлежащие к классу гидролаз, катализируют гидролиз 3-1,4-гликозидные связи в целлюлозе с образованием глюкозы или дисахарида целлобиозы [4–6]. Среди большого разнообразия микроорганизмов, участвующих в биоконверсии растительного сырья, важную роль играют микроскопические грибы [7, 8]. В связи с этим селекция микромицетов – активных продуцентов целлюлаз, участвующих в микробной конверсии целлюлозосодержащего растительного сырья, является актуальной биотехнологической задачей.

Возможность проведения подобных исследования не в последнюю очередь определяется наличием в ФГБНУ ВИЛАР коллекции микромицетов, содержащей 49 штаммов грибов, относящихся к 40 видам. Ранее был предложен алгоритм поиска продуцентов протеиназ, гидролизующих коллаген, кератин и другие белки [9, 10].

Цель исследования – разработка методических подходов для селекции целлюлозолитических микромицетов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Aspergillus flavus* FAf-52-2016, *A. mangini* FAm-30-2016, *Cladosporium cladosporioides* FCc-35-2016, *Penicillium citrinum* FPc-54-2016, *P. martensii* FPm-47-2016 и FPm-63-2017. Микромицеты выращивали на скошенной поверхности агаризованной среды Чапека при 24 °С в течение семи суток. Затем проводили посев тремя уколами на чашки Петри с агаризованной средой следующего состава (%): $NaNO_3$ – 0,2; KH_2PO_4 – 0,1; $MgSO_4\times7H_2O$ – 0,05; KCl – 0,05; $FeSO_4\times7H_2O$ – 0,001; $CaCO_3$ – 0,3; целлюлоза – 0,5; агар-агар – 2 без сахарозы. В качестве источников целлюлозы использовали: HL-, APX-, TLC-целлюлозу («Serva»), микроцеллюлозу («Эвалар»), траву зверобоя («Hyperici herba», «Красногорсклексредства»).

Целлюлозолитическую активность микроорганизмов оценивали по скорости радиального роста колоний на соответствующих субстратах. Диаметр колоний измеряли в двух перпендикулярных направлениях, измеряли диаметр зон лизиса (если они были) и рассчитывали индексы лизиса по ранее предложенной схеме [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что одним из способов экзогенной регуляции синтеза различных гидролаз у мицелиальных грибов является использование в процессе их культивирования соответствующих субстратов-индукторов. Для выбора индукторов, обеспечивающих максимальный синтез гидролаз, необходимо оценить степень биодеградации микроорганизмами различных субстратов, используя комплекс ростовых характеристик, включающих диаметр колоний, скорость роста и индекс лизиса. В связи с этим проводилась сравнительная оценка роста микромицетов на агаризованных средах, содержащих различные целлюлозные субстраты.

Показано, что *P. citrinum* образовывал колонии при культивировании на средах, содержащих все виды целлюлозы, использованные в работе (рис. 1). Максимальная средняя скорость роста микромицета наблюдалась при культивировании на среде с HL-целлюлозой. На других средах она была примерно в 1,5 раза ниже. На этой же среде, в отличие от других, рост колоний обнаруживался уже на ранних сроках культивирования (трое суток).

При изучении характера роста *C. cladosporioides* на целлюлозных средах обнаружены аналогичные закономерности (рис. 2). Средняя скорость роста на HL-целлюлозе была в 4–6 раз выше, чем на других средах. Кроме того, следует отметить отсутствие замедления роста культуры на среде с HL-целлюлозой до конца культивирования. При росте на других, средах максимальные скорости фиксировалась на пятые сутки, а затем снижались, свидетельствуя об истощении доступных источников углерода.

На начальных этапах культивирования *A. flavus* наибольшая скорость роста также наблюдалась на среде с HL-целлюлозой, однако затем был отмечен быстрый лизис колоний (рис. 3). Средние скорости роста микромицета колебались в небольшом диапазоне от 0,4 до 0,7 мм/сут, при этом максимальная средняя скорость роста наблюдалась при культивировании на среде с АРХ-целлюлозой.

При культивировании *P. martensii* № 47 максимальная скорость роста отмечена на среде с МКЦ-целлюлозой (рис. 4). На указанном субстрате она была выше, чем у всех остальных изученных культур.

На последних этапах культивирования на средах с TLC-целлюлозой и МКЦ (11–14-е сутки соответственно) наблюдалось обильное спороношение.

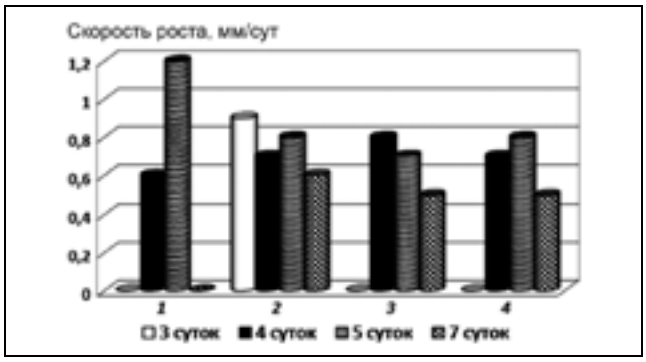

Рис. 1. Изменение скорости роста *P. citrinum* при культивировании на средах с целлюлозой: *1* – МКЦ; *2* – HL-целлюлоза; *3* – АРХ-целлюлоза; *4* – TLC-целлюлоза

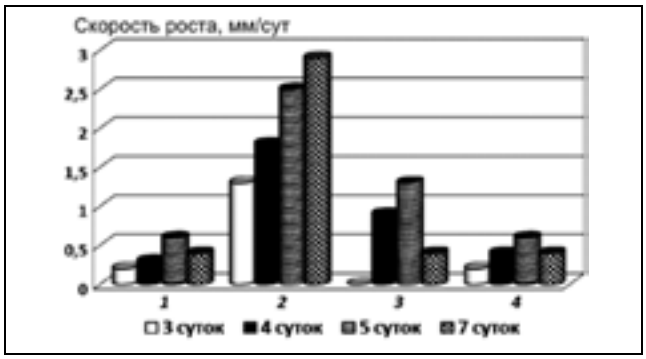

Рис. 2. Изменение скорости роста *C. cladosporioides* при культивировании на средах с целлюлозой: *1* – МКЦ; *2* – HL-целлюлоза; *3* – АРХ-целлюлоза; *4* – TLC-целлюлоза

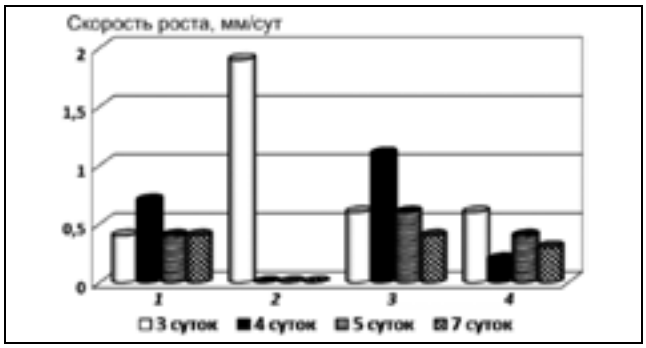

Рис. 3. Изменение скорости роста *A. flavus* при культивировании на средах с целлюлозой: *1* – МКЦ; *2* – HL-целлюлоза; *3* – АРХ-целлюлоза; *4* – TLC-целлюлоза

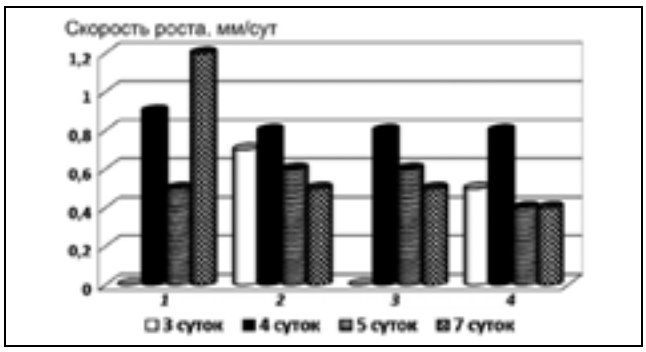

Рис. 4. Изменение скорости роста *P. martensii* FPm-47-2016 при культивировании на средах с целлюлозой: *1* – МКЦ; *2* – HL-целлюлоза; *3* – АРХ-целлюлоза; *4* – TLC-целлюлоза

На рис. 5 и 6 видно большое количество спор вокруг белых полупрозрачных колоний. Наличие заметного образования спор может свидетельствовать об адаптации изучаемого штамма *P. martensii* к росту на указанных целлюлозных субстратах. В связи с этим споры были пересеяны на среду Чапека. Полученному штамму *P. martensii* присвоен коллекционный номер FPm-63-2017 в биоколлекции мицелиальных грибов ВИЛАР.

Способность к росту у микромицета *A. mangini* была крайне низкой на всех целлюлозосодержащих средах, кроме среды с АРХ-целлюлозой, на которой роста колоний не обнаружено (рис. 7). Средние скорости роста на других целлюлозных средах составляли 0,3–0,4 мм/сут.

В качестве примера растительного сырья, содержащего целлюлозу, была использована трава зверобоя. Характер роста культур на среде с травой зверобоя существенно отличался от такового на других целлюлозных средах.

Например, у *C. cladosporioides* на среде с травой зверобоя отмечались хорошо видимые колонии (рис. 8), тогда как на среде с HL-целлюлозой колонии были едва видимые, полупрозрачные (рис. 9). При этом максимальные диаметры колоний у *C. cladosporioides* наблюдались при росте на среде со зверобоем. На HL-целлюлозе они были в 0,8–1,9 раза меньше в те же сроки культивирования.

Обнаружено, что скорости роста у всех исследованных микромицетов на среде с травой зве-

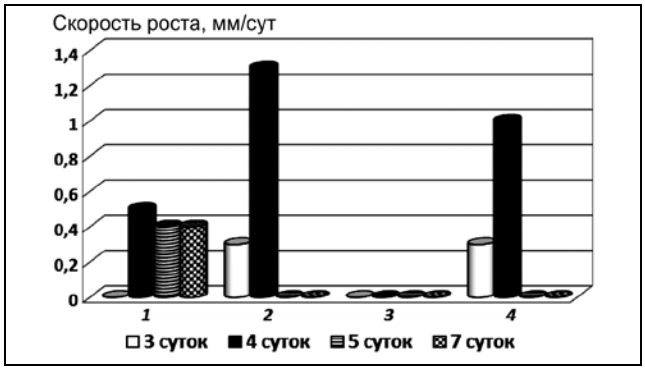

Рис. 7. Изменение скорости роста *A. mangini* при культивировании на средах с целлюлозой: *1* – МКЦ; *2* – HL-целлюлоза; *3* - АРХ – целлюлоза; *4* – TLC-целлюлоза

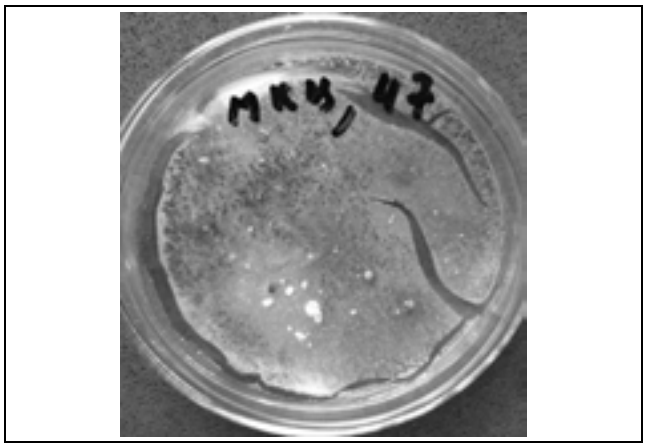

Рис. 5. Рост *P. martensii* на среде с МКЦ на 14-е сутки

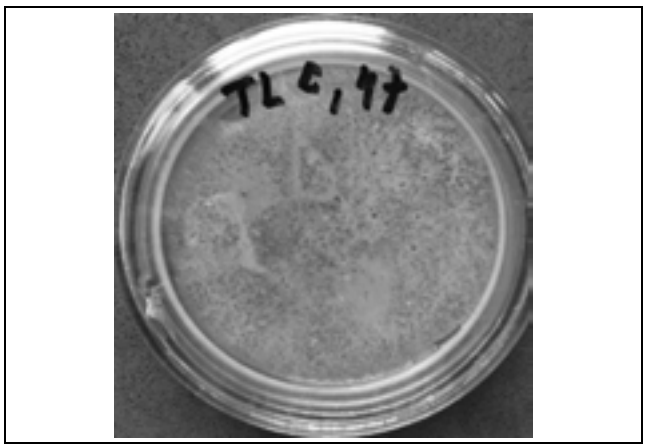

Рис. 6. Рост *P. martensii* на среде с TLC –целлюлозой на 11-е сутки

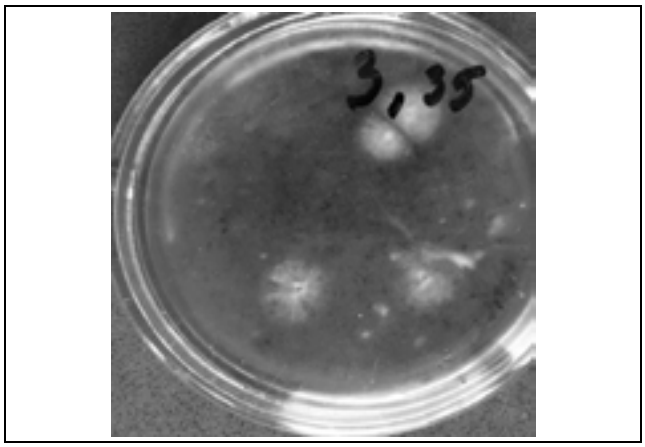

Рис. 8. Рост *C. cladosporioides* на среде с травой зверобоя на 5-е сутки

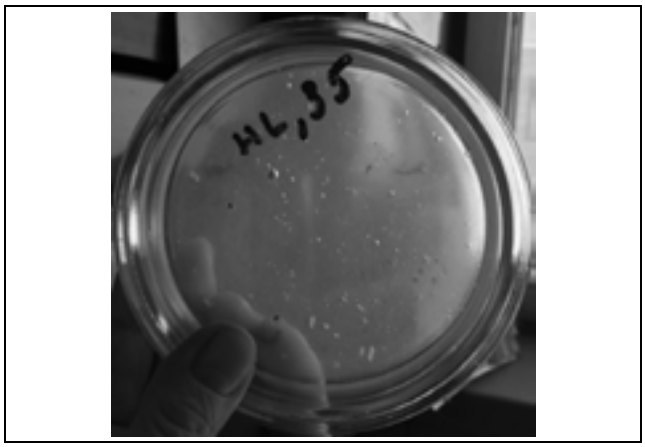

Рис. 9. Рост *C. cladosporioides* на среде с HL-целлюлозой на 5-е сутки

робоя были значительно выше, чем на других целлюлозных средах (рис. 11). Средняя скорость роста на среде с травой зверобоя по сравнению с максимальной скоростью роста на других средах бала больше для *A. flavus* – в 5 раз, для *P. citrinum* – в 3 раза, для *C. cladosporioides* – в 1,3 раза, для *A. mangini* – в 4,2 раза, для *P. martensii* FPm-47-2016 – в 9 раз и для *P. martensii* FPm-63-2017 – в 9,1 раза.

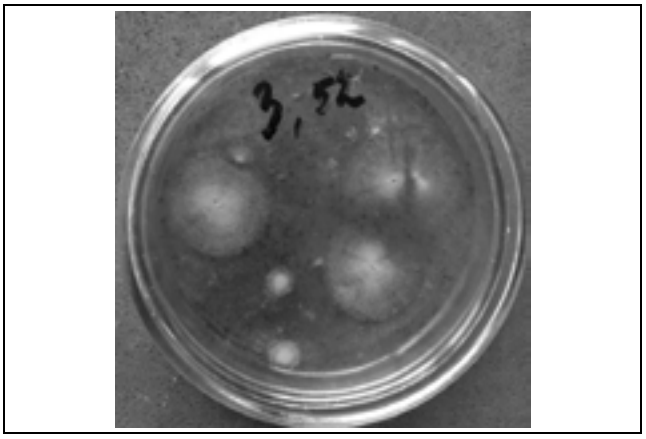

Рис. 10. Рост *A. flavus* на среде с травой зверобоя на 7-е сутки

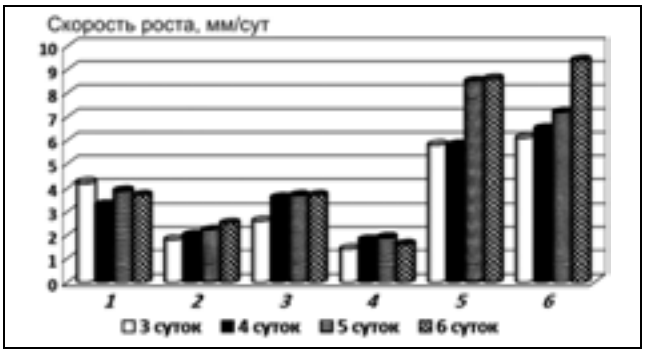

Рис. 11. Скорости роста различных микромицетов при культивировании на среде с травой зверобоя: *1 - A. flavus*; *2 - P. citrinum*; *3 - C. cladosporioides*; *4 - A. mangini*; *5 - P. martensii* FPm-47-2016; *6 - P. martensii* FPm-63-2017

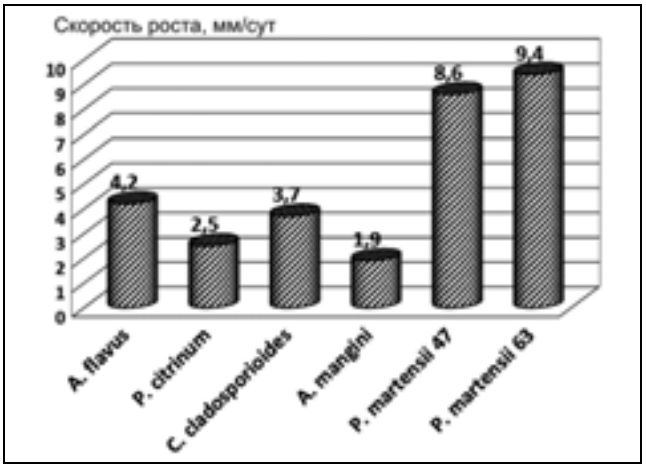

Рис. 12. Максимальные скорости роста микромицетов при поверхностном культивировании на средах с травой зверобоя

Сравнение максимальных скоростей роста микромицетов на среде с травой зверобоя показало что штаммы *P. martensii* обладали наибольшим потенциалом для утилизации этого субстрата (рис. 12). Максимальные скорости роста у *P. martensii* были в 2–4 раза больше, чем у остальных исследованных микромицетов. Максимальная скорость роста нового адаптированного к целлюлозе штамма *P. martensii* FPm-63-2017 была на 9,3% выше, чем у исходного штамма.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что коллекционные культуры росли на всех средах, содержащих целлюлозу, за исключением *A. mangini* на среде с АРХ-целлюлозой.
2. Выявлены особенности интенсивности и характера роста изученных микромицетов при использовании в средах различных типов целлюлозы. Значительно менее выраженный рост всех микроорганизмов на средах с целлюлозой по сравнению со средой с травой зверобоя, содержащей помимо целлюлозы другие источники углерода, свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения целлюлозолитической активности микромицетов при введении в среды с целлюлозой дополнительных энергетических источников, стимулирующих начальный рост культур. Обнаруженные зоны лизиса на среде с травой зверобоя у коллекционного штамма *A. flavus,* являющегося, по нашим данным продуцентом коллагеназ, делает этот микромицет одним из наиболее перспективных и для использования в качестве продуцента целлюлаз.
3. В ходе проведенных экспериментов получен новый адаптированный к целлюлозе штамм *P. martensii*, также перспективный для дальнейшего изучения в качестве продуцента целлюлаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В*. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлазной биомассы // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. Р. 674–680.
2. *Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И.* Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Древесина и разлагающие ее грибы. М.: Наука. 2001. 264 с.
3. *Рабинович М. Л., Мельник М.С.* Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биодеграда-

ции высокоупорядоченных форм целлюлозы // Успехи биологической химии. 2000. № 40. С. 205–266.
4. *Чекушина А.В.* Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma, Penicillium* и *Myceliophtora* с увеличенной гидролитической активностью: Автореф. дисс. … канд. хим. наук. М. 23 с.
5. *Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П.* Компонентный состав коммерческих ферментных препаратов, полученных с помощью грибов рода *Trichoderma* и предназначенных для биоконверсии растительного сырья // Биотехнология. 2013. № 3. С. 58–68.
6. *Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П.* Ферментные препараты *Penicillium verruculosum* для биоконверсии растительного сырья – альтернатива коммерческим препаратам, полученных с помощью грибов рода Trichoderma // Биотехнология. 2013. № 3. С. 69–80.
7. *Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В.* Структура и механизм действия целлюлолитических ферментов // Биохимия. 2002. Т. 67. № 8. С. 1026–1050.
8. *Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В.* Целлюлазы микроорганизмов // Прикладная биохимическая микробиология. 2002. Т. 38. № 4. С. 355–373.
9. *Никитина З.К., Гордонова И.К.* Выделение, очистка и биохимические свойства кератинолитического фермента, секретируемого *Penicillium citrinum* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 1. С. 36–41.
10. *Сухосырова Е.А., Никитина З.К., Яковлева М.Б.* Выделение, очистка и некоторые свойства коллагенолитических ферментов, секретируемых *Aspergillus flavus* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2008. № 2. С. 46–49.
11. *Никитина З.К., Яковлева М.Б., Гордонова И.К., Зон Хы Чол.* Сравнительная оценка роста дейтеромицетов при использовании различных белоксодержащих субстратов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 11. С. 56–59.

Поступила 30 января 2018 г.

THE DEVELOPMENT OF THE METHODICAL APPROACHES TO SEARCH FOR PRODUCERS OF CELLULASE

© Z.K. Nikitina, I.K. Gordonova, 2018

Z.K. Nikitina
Dr.Sc. (Biol), Professor, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: nikitinaz@yandex.ru
I.K. Gordonova
Ph.D. (Biol), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

Cellulose is the most abundant biopolymer on the earth, which holds a special place in the cycle of organic carbon. The hydrolysis of this polysaccharide occurs under the action of cellulase, which are produced by many microorganisms: micromycetes, aerobic and anaerobic bacteria. The intensity of cellulases studies increased sharply in the 1970s which was due with the energy crisis. The shortage of non-renewable sources of energy and materials is observed at present time too. Cellulose is an almost inexhaustible source of renewable raw materials, which can be converted enzymatically into glucose for further production of biofuel, amino acids, feed protein, etc. The main aim of this work was to develop the methodological approaches for selection of micromycetes with some cellulose activity.

By means of surface cultivation on media with different types of cellulose the growth characteristics of 6 strains of micromycetes from the collection of VILAR were evaluated. It is established that all strains grew on all media containing cellulose. The peculiarities of the intensity and micromycetes character growth during different types of celluloses using were identified. The most intensive growth of micromycetes was observed on the medium with the *Hyperici herba*. Discovered zones of lysis on the media with the *Hyperici herba* during *A. flavus* studying allows to regard this micromycete as one of the most promising producer of cellulase. New strain of *P. martensii* adapted to the cellulose was obtained, and it was also promising as cellulase producer.

Key worlds: *micromycetes, cellulose, cellulase.*

For citation: Nikitina Z.K., Gordonova I.K. The development of the methodical approaches to search for producers of cellulase. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(3):27–31. **DOI: 10.29296/25877313-2018-03-05**

REFERENCES

1. Skomarovskij A.A., Markov A.V., Gusakov A.V. Novye celljulazy dlja vysokojeffektivnogo gidroliza lignocelljulaznoj biomassy // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. 2006. T. 42. № 6. R. 674–680.
2. Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Kondrashhenko V.I. Teoreticheskie osnovy biotehnologii drevesnyh kompozitov. Drevesina i razlagajushhie ee griby. M.: Nauka. 2001. 264 s.
3. Rabinovich M. L., Mel'nik M.S. Progress v izuchenii celljuloliticheskih fermentov i mehanizm biodegradacii vysokouporjadochennyh form celljulozy // Uspehi biologicheskoj himii. 2000. № 40. S. 205–266.
4. Chekushina A.V. Celljuloliticheskie fermentnye preparaty na osnove gribov Trichoderma, Penicillium i Myceliophtora s uvelichennoj gidroliticheskoj aktivnost'ju: Avtoref. diss. … kand. him. nauk. M. 23 s.
5. Chekushina A.V., Docenko G.S., Kondrat'eva E.G., Sinicyn A.P. Komponentnyj sostav kommercheskih fermentnyh preparatov, poluchennyh s pomoshh'ju gribov roda Trichoderma i prednaznachennyh dlja biokonversii rastitel'nogo syr'ja // Biotehnologija. 2013. № 3. S. 58–68.
6. Chekushina A.V., Docenko G.S., Kondrat'eva E.G., Sinicyn A.P. Fermentnye preparaty Penicillium verruculosum dlja biokonversii rastitel'nogo syr'ja – al'ternativa kommercheskim preparatam, poluchennyh s pomoshh'ju gribov roda Trichoderma // Biotehnologija. 2013. № 3. S. 69–80.
7. Rabinovich M.L., Mel'nik M.S., Bolobova A.V. Struktura i mehanizm dejstvija celljuloliticheskih fermentov // Biohimija. 2002. T. 67. № 8. S. 1026–1050.
8. Rabinovich M.L., Mel'nik M.S., Bolobova A.V. Celljulazy mikroorganizmov // Prikladnaja biohimicheskaja mikrobiologija. 2002. T. 38. № 4. S. 355–373.
9. Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Vydelenie, ochistka i biohimicheskie svojstva keratinoliticheskogo fermenta, sekretiruemogo Penicillium citrinum // Voprosy biologiche-skoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. 2013. № 1. S. 36–41.
10. Suhosyrova E.A., Nikitina Z.K., Jakovleva M.B. Vydelenie, ochistka i nekotorye svojstva kollagenoliticheskih fermentov, sekretiruemyh Aspergillus flavus // Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. 2008. № 2. S. 46–49.
11. Nikitina Z.K., Jakovleva M.B., Gordonova I.K., Zon Hy Chol. Sravnitel'naja ocenka rosta dejteromicetov pri ispol'zovanii razlichnyh beloksoderzhashhih substratov // Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. 2015. № 11. S. 56–59.