**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА
ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ****ON THE INFLUENCE OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON
CELLULOLYTICUS ACTIVITY OF MICROORGANISMS****НИКИТИНА З.К.
ГОРДОНОВА И.К.****NIKITINA S.K.
GORDONOVA I.K.***ФГБНУ Всероссийский научно-
исследовательский институт
лекарственных и ароматических
растений (ВИЛАР)**All-Russian Scientific Institute of Medicinal
and Aromatic Plants**nikitinaz@yandex.ru**nikitinaz@yandex.ru**doi: 10.18411/pivsn-4**idsp: pivsn-4***АННОТАЦИЯ**

Целью настоящего исследования является оптимизация условий культивирования микромицетов для инициации синтеза целлюлаз. Установлена способность исследованных микроорганизмов утилизировать целлюлозу. Оптимизированы условия культивирования для инициации синтеза целлюлаз. Показано, что гидролитическая активность культур меняется в следующем ряду: *A. flavus* > *P. citrinum* > *E. coli* > *P. martensii*.

Ключевые слова: микромицеты, бактерии, целлюлоза, целлюлазы

ABSTRACT

The aim of this study is to optimize the micromycetes cultivation conditions to initiate the synthesis of cellulases. The ability of the studied microorganisms to utilize cellulose was established. Cultivation conditions for initiation of cellulase synthesis have been optimized. It is shown that the hydrolytic activity of cultures are changing in the next row: *A. flavus* > *P. citrinum* > *E. coli* > *P. martensii*.

Keywords: micromycetes, bacteria, cellulose, cellulase

ВВЕДЕНИЕ

Целлюлоза является самым распространенным органическим источником для получения продуктов питания, топлива и химических веществ [1]. Однако возможность использования этого биополимера требует его конверсии до уровня глюкозы или целлобиозы. Деструкция с помощью химических или температурных факторов мало эффективна, так как может приводить к разрушению сахаров. Поэтому наиболее применимым способом конверсии целлюлозного сырья является ее ферментативное расщепление с помощью различных микроорганизмов: бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов [2 - 4]. В связи с этим поиск микроорганизмов – активных продуцентов целлюлаз является актуальной биотехнологической задачей. При этом для тестирования большого количества штаммов с успехом могут быть применены разнообразные скрининг-методы [5]. Целью настоящего исследования является оптимизация условий культивирования микромицетов для инициации синтеза целлюлаз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования служили следующие виды микроорганизмов: бактерии - *Escherichia coli* ATCC 25922 (ГКПМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича) и микромицеты – *Aspergillus flavus* F 52, *Penicillium citrinum* F 54, *P. martensii* F 63 (коллекция ФГБНУ ВИЛАР). Бактерии выращивали на скошенной поверхности мясо-пептонного агара при 37⁰С, микромицеты – на среде Чапека при 24⁰С. Затем проводили посев тремя уколами на агаризованные среды следующего состава. Для культивирования микромицетов среда содержала (%): NaNO₃ - 0,2; KН₂РO₄ - 0,1; MgSO₄ x 7H₂O - 0,05; KCl - 0,05; FeSO₄ x 7H₂O - 0,001; CaCO₃ - 0,3; агар-агар – 2 с 0,5% сахарозы или без нее. При культивировании бактерий использовался минеральный фон среды М9: Na₂НРO₄ – 6 г, KН₂РO₄ – 3 г, NaCl – 0,5 г, NH₄Cl – 1 г, 1М MgSO₄ – 2 мл, 1М СаCl₂ – 0,1 мл, тиамина хлорида – 5 мг, агар – 20 г, H₂O – до 1 л с добавлением 0,1% глюкозы или без него. В качестве источников целлюлозы использовали HL-целлюлозу (Serva) со степенью полимеризации 180-200 в концентрации 0,5%. Целлюлолитическую активность микроорганизмов оценивали по скорости радиального роста колоний. Диаметр колоний измеряли в двух перпендикулярных направлениях. Кроме того, на разных этапах культивирования чашки Петри открывали, заливали на несколько минут раствором Люголя для окрашивания, измеряли диаметр зон лизиса и рассчитывали индексы лизиса по ранее предложенной схеме [6].

Известно, что рост микроорганизмов в условиях полной или частичной замены легко усвояемого источника углерода на трудно метаболизируемые биополимеры, например, целлюлозу, позволяет оценить их потенциальную гидролитическую активность. Появление зон лизиса целлюлозы вокруг колоний является показателем секреции ферментов в окружающую среду [5]. В связи с этим на первом этапе исследования фиксировались диаметры колоний и диаметры зон лизиса при культивировании микроорганизмов на средах с полной или частичной заменой сахарозы на целлюлозу (табл. 1 - 4).

Таблица 1

Параметры роста *A. flavus* F-52 при культивировании
на средах с целлюлозой

Среда	Время культивирования, сутки									
	3		4		5		6		7	
	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
целлюлоза	5,8	-	рн		рн		рн		рн	
целлюлоза +сахароза	10,6	-	13,6	-	16,0	30,3	19,6	28,6	21,3	39,5

Примечание: здесь и в других таблицах Дк – диаметр колоний в мм, Дл – диаметр зон лизиса в мм, рн – роста нет, ин – исследования не проводились.

При полном отсутствии в средах сахарозы рост колоний микромицета *A. flavus* наблюдался только в течение первых трех суток культивирования. Затем колонии исчезали, вероятно, вследствие лизиса (табл. 1). Внесение небольшого количества сахарозы в среду (0,5% по сравнению с обычно применяемыми 2 – 3%) обеспечивало активный рост гриба и образование заметных зон лизиса на 5-7 сутки культивирования (рис. 1).

Другие закономерности обнаружены при культивировании *P. citrinum* на средах с целлюлозой без сахаров: небольшой рост колоний без образования зон лизиса фиксировался до 5 суток (табл. 2). Внесение сахарозы, так же как и в первом случае вызывало активный рост микромицета. Однако секреция целлюлаз с образованием видимых зон лизиса наблюдалась в отличие от *A. flavus* на всех этапах культивирования.

Рис. 1. Колонии и зоны лизиса *A. flavus* при культивировании на среде с частичной заменой сахарозы на целлюлозу. Окраска раствором Люголя

Таблица 2

Параметры роста *P. citrinum* F-54 при культивировании на средах с целлюлозой

Среда	Время культивирования, сутки									
	3		4		5		6		7	
	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
целлюлоза	2,7	-	2,7	-	4,1	-	3,9	-	4,0	-
целлюлоза +сахароза	7,9	11,6	15,1	22,2	20,0	28,3	23,0	29,2	27,2	42,2

Подобным образом менялись при культивировании и параметры роста следующей исследуемой культуры – *P. martensii* (рис. 2). Однако можно отметить некоторые особенности (табл. 3). На средах без сахарозы небольшой рост гриба без видимых зон лизиса отмечался до 6 суток культивирования. Внесение сахарозы в большей степени стимулировало рост колоний и образование зон лизиса. Так на 6 сутки культивирования диаметр колоний *P. martensii* был в 2,2 и 1,9 раза больше, чем у *A. flavus* и *P. citrinum* соответственно.

Рис. 2. Колонии и зоны лизиса *P. martensii* на средах с частичной заменой сахарозы на целлюлозу. Слева – 3 сутки культивирования, без окраски. Справа – 4 сутки культивирования, окраска раствором Люголя

Таблица 3

Параметры роста *P. martensii* F-63 при культивировании на средах с целлюлозой

Среда	Время культивирования, сутки									
	3		4		5		6		7	
	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
целлюлоза	2,8	-	3,3	-	3,2	-	3,7	-	3,7	-
целлюлоза +сахароза	15,5	25,3	27,9	29,9	35,8	39,3	43,7	47,7	ин	ин

Известно, что некоторые штаммы аэробных и анаэробных бактерий могут обладать целлюлолитической активностью [3]. В связи с этим на следующем этапе исследования проводилось сравнительное изучение гидролитической активности *E.coli* и микромицетов (табл. 4). При культивировании *E. coli* на средах с целлюлозой без глюкозы наблюдался заметный рост колоний до 5 суток культивирования. Диаметр колоний был наибольшим из всех исследованных культур (табл. 4). Так на 6 сутки роста диаметр колоний *E. coli* превышал аналогичный показатель у грибов в 2,2 - 2,4 раза. Кроме того, в отличие от грибов выявлено образование зон лизиса на этой среде. Начиная с 5 суток рост колоний прекращался, однако зоны лизиса продолжали увеличиваться, что свидетельствует о дальнейшей секреции целлюлаз. Показано, что введение в среду 0,1% глюкозы в меньшей степени стимулирует рост и образование зон лизиса у бактерии по сравнению с микромицетами.

Таблица 4

Параметры роста *E. coli* при культивировании
на средах с целлюлозой

Среда	Время культивирования, сутки							
	3		4		5		6	
	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
целлюлоза	5,8	-	9,0	-	9,5	11,5	9,5	15,4
целлюлоза +глюкоза	10,3	-	12,3	-	12,3	14,3	12,3	19,2

Наряду с такими параметрами роста микроорганизмов, как диаметр колоний и зон лизиса, важным показателем является индекс лизиса. Индекс лизиса определяется соотношением площади колонии и площади зоны лизиса и характеризует удельную протеолитическую активность культуры, так как площадь колонии пропорциональна ее биомассе, а площадь зоны лизиса – активности секретируемых целлюлаз. В связи с этим на следующем этапе исследования были рассчитаны индексы лизиса микроорганизмов при росте на средах, содержащих целлюлозу (табл. 5).

Таблица 5

Индексы лизиса микроорганизмов при росте на средах с целлюлозой

Культура	Среда	Время культивирования, сутки				
		3	4	5	6	7
<i>E. coli</i>	целлюлоза	-	-	1,47	2,63	ин
	целлюлоза +глюкоза	-	-	1,35	2,44	ин
<i>A.flavus</i>	целлюлоза +сахароза	-	-	3,59	2,13	3,44
<i>P.citrinum</i>	целлюлоза +сахароза	2,25	2,17	2,08	1,93	2,41
<i>P. martrnsii</i>	целлюлоза +сахароза	2,85	1,14	1,24	1,19	ин

Можно видеть, что индексы лизиса изученных микромицетов различаются и лежат в диапазоне от 1,14 до 3,59. Оба представителя рода *Penicillium* быстро адаптируются к росту на средах, содержащих целлюлозу, о чем свидетельствует появление зон лизиса уже на 3 сутки культивирования. В дальнейшем у *P. martensii* наблюдается снижение индексов лизиса, тогда как у *P.citrinum* указанный показатель меняется незначительно. Значительно медленнее адаптация происходит у *A.flavus*, однако наибольшие индексы лизиса отмечены именно у этой культуры. Индексы лизиса бактериальной культуры лежали в диапазоне от 1,35 до 2,63 незначительно отличаясь от аналогичных показателей мицелиальных грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена способность исследованных микроорганизмов утилизировать целлюлозу. Оптимизированы условия культивирования для инициации синтеза целлюлаз. На основании сравнения средних индексов лизиса можно считать, что гидролитическая активность культур меняется в следующем ряду: *A. flavus* > *P. citrinum* > *E. coli* > *P. martensii*. Однако относительно небольшие диаметры колоний *E. coli* на средах с целлюлозой, свидетельствующие о незначительном накоплении биомассы, не позволяют на данном этапе исследования рекомендовать культуру в качестве потенциального продуцента целлюлаз. В то же время высокие скорости роста *P. martensii* на фоне относительно низких индексов лизиса делает микробицет перспективным для дальнейшего исследования.

1. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондрашенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Древесина и разлагающие ее грибы. М.: Наука. 2001. 264 с.
2. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Структура и механизм действия целлюлолитических ферментов // Биохимия. 2002. Т. 67. № 8. С. 1026-1050
3. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлазной биомассы // Прикл. биохим. и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674-680
4. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Целлюлазы микроорганизмов // Прикл. биохим. и микробиология. – 2002. – Т. 38, №4. – С. 355-373
5. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии (Обзор). Часть 1. Поиск микроорганизмов-продуцентов ферментов. // Вопросы биол., медицинской и фармацевтической химии - 2016. - № 4. - С. 23-32
6. Никитина З.К., Яковлева М.Б., Гордонова И.К., Зон Хы Чол Сравнительная оценка роста дейтеромицетов при использовании различных белоксодержащих субстратов // Вопросы биол., медицинской и фармацевтической химии. – 2015. - № 11. – С. 56-59