

ОЦЕНКА ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ

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)

Целью работы являлась оценка целлюлазной активности микромицетов из биоколлекции ФГБНУ ВИЛАР. Показано, что исследованные микромицеты растут на средах с целлюлозными субстратами. Введение сахарозы в среды не препятствует синтезу целлюлаз. Глубинное культивирование подтвердило секрецию целлюлозолитических ферментов *Penicillium citrinum*.

Ключевые слова: микромицеты, целлюлазы, *Penicillium citrinum*.

Для цитирования: Никитина З.К., Гордонова И.К. Оценка целлюлазной активности микромицетов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018; 21(6):20–26. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-04>

Целлюлазы относятся к группе ферментов, которые, действуя вместе, гидролизуют целлюлозу [1]. Целлюлоза – линейный полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, связанных β -1,4 связями. Целлюлоза является главной составной частью всякого растительного материала, и синтез ее по своим масштабам превосходит синтез всех других природных соединений [2]. Сохраняющиеся в почве и возвращающиеся в нее растительные остатки на 40–70% состоят из целлюлозы.

Целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнин, объединяясь в разных пропорциях, образуют лигноцеллюлозный материал, на долю которого приходится основная часть биомассы, остающейся в огромном количестве в виде отходов сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и других отраслей хозяйственной деятельности человека [3]. Целлюлоза является самым распространенным органическим источником для получения продуктов питания, топлива и химических веществ [2]. Однако возможность использования этого биополимера требует его конверсии до уровня глюкозы или целлобиозы. Деструкция с помощью химических или температурных факторов малоэффективна, 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 [4, 5]. В настоящее время выявлены микроорганизмы, син-

тезирующие целлюлазы, охарактеризованы свойства ферментов, входящих в целлюлолитические комплексы [6–8]. Однако это не уменьшает актуальности поиска новых продуцентов.

Цель работы – оценка целлюлазной активности некоторых микромицетов из биоколлекции ФГБНУ ВИЛАР.

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 7 суток. Затем проводили посев тремя уколами на чашки Петри с агаризованной средой следующего состава (%): NaNO₃ – 0,2; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄×7H₂O – 0,05; KCl – 0,05; FeSO₄×7H₂O – 0,001; CaCO₃ – 0,3; целлюлоза – 0,5; агар-агар – 2 без сахарозы или с 0,5% сахарозы. В качестве источников целлюлозы использовали метилцеллюлозу водорастворимую МЦ-16 и МЦ-35 (АО «Рехахим», Россия). Целлюлозолитическую активность микроорганизмов оценивали по скорости роста колоний на соответствующих субстратах. Кроме того, на последнем этапе культивирования чашки Петри открывали, заливали на несколько минут раствором Люголя (ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика», Россия) для окрашивания, измеряли диаметр

зон лизиса (если они были) и рассчитывали индексы лизиса по ранее предложенной схеме [9].

Культивирование *P. citrinum* в глубинных условиях проводили в колбах вместимостью 300 мл со 100 мл питательной среды на качалке при скорости вращения 220 об/мин при 26 °С. Посевным материалом служила суспензия спор семисуточных культур дейтеромицета. Количество посевного материала составляло $2,6\text{--}3,6 \times 10^8$ спор на 100 мл среды. Культивирование осуществляли на модифицированной среде Чапека с частичной заменой сахарозы на МЦ-35 (0,5% сахарозы и 0,5% целлюлозы).

Для выявления целлюлазной активности через определенные интервалы времени отбирали аликвоты по 5 мл. Фильтрат культуральной жидкости дейтеромицета, полученный путем ее пропускания через мембранный фильтр с диаметром пор 0,23 мкм, добавляли к суспензии микрокристаллической целлюлозы (100 мг/мл) в 0,1 М Натриевой буфере (рН 5,0) и инкубировали в течение 48 ч (исчерпывающий гидролиз) при температуре 40 °С. После 20-минутного кипячения с последующим центрифугированием при 6000 об/мин в течение 60 мин в супернатанте проводили оценку общей целлюлазной активности методом определения восстанавливающих сахаров (ВС) с использованием натриевой соли динитросалициловой кислоты [10]. Параллельно в фильтрате культуральной жидкости определяли концентрацию сахарозы [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что скорость роста микроорганизмов в условиях полной или частичной замены легко усвояемого источника углерода на трудно метаболизируемые биополимеры, например целлюлозу, позволяет оценить их потенциальную гидролитическую активность [2]. Появление зон лизиса целлюлозы вокруг колоний является показателем секреции ферментов в окружающую среду. В связи с этим на начальном этапе исследования фиксировались скорости роста колоний при культивировании микромицетов на средах с полной или частичной заменой сахарозы на метилцеллюлозу.

У всех исследованных микромицетов на 3-и сутки культивирования на средах с метилцеллюлозой без сахарозы наблюдался рост колоний (рис. 1,а). Однако скорость роста была незначительной, а колонии – тонкими, почти прозрачными (рис. 2). Для всех культур, кроме *P. citrinum*, ско-

рость роста на средах с МЦ-16 была ниже, чем на МЦ-35, что может быть связано с большей степенью полимерности МЦ-35 и необходимостью более интенсивного гидролиза целлюлозы для образования низкомолекулярных сахаров.

На 4-е сутки культивирования у обоих штаммов *P. martensii* наблюдались прекращение роста и лизис колоний на обеих средах (рис. 1,б). Аналогичным образом на этом сроке культивирования исчезали колонии *P. mangini*, *P. citrinum* и *C. cladosporioides* на среде с МЦ-35. Скорости роста этих культур на среде с МЦ-16 менялись незначительно. Активный рост на обеих средах с метилцеллюлозой отмечен у единственной культуры – *A. flavus*. Однако на 5-е сутки культивирования и этот микромицет прекращал рост, как и все остальные, кроме *P. mangini* на среде с МЦ-16. При последующем культивировании роста колоний не наблюдалось.

Добавление к целлюлозным средам небольшого количества сахарозы (0,5% вместо обычно используемых 2–3%) вызывало увеличение скорости роста (табл. 1). Так, на 3-и сутки культивирования на средах с МЦ-35 скорость роста *P. martensii* F-47 и *P. martensii* F-63 возрастала в 3,2 и 3,5 раза при введении в среду сахарозы. Аналогичные закономерности отмечены и для всех остальных культур, кроме *A. flavus*, у которой происходило

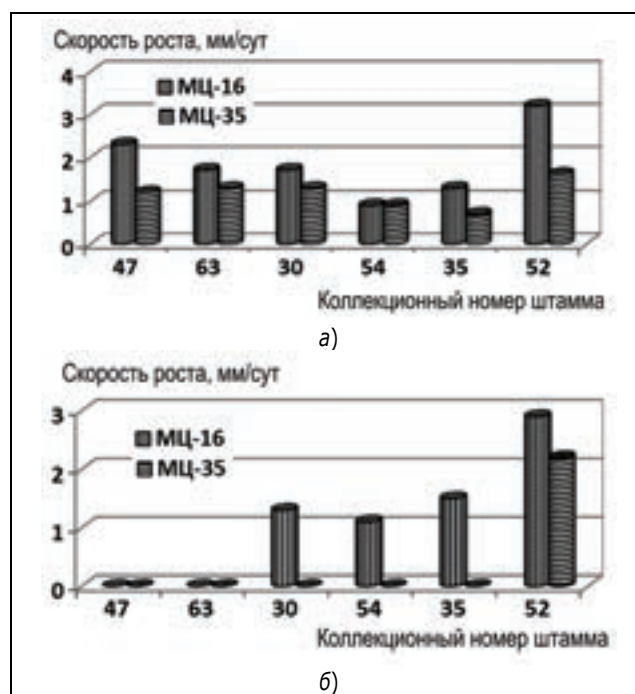


Рис. 1. Радиальная скорость роста микромицетов на средах с метилцеллюлозой без сахарозы: а – 3-и сутки; б – 4-е сутки культивирования

увеличение скорости только на 27% при внесении сахарозы в среду. Показано, что в процессе культивирования грибов до 7 суток не наблюдается существенного снижения скорости роста, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности культур. При внесении в среды сахарозы существенно изменяется и характер роста колоний (рис. 2). Колонии становятся объемными, плотными, хорошо видимыми.

Анализ изменения скорости роста микромицетов в процессе культивирования свидетельствует о том, что она меняется в очень небольшом диапазоне (табл. 1). Это делает возможным срав-

нение гидролитической активности культур по средней скорости роста за все время культивирования (рис. 3).

Из шести исследованных грибов наибольшие скорости роста зафиксированы для *P. martensii* F-63, штамма, который был получен из *P. martensii* F-47 путем адаптации культуры к росту на целлюлозных средах [11]. У большинства культур скорости роста на среде МЦ-16 были выше, чем на среде МЦ-35. Исключением являлась культура *C. cladosporioides* F-35, для которой скорость роста на МЦ-35 была выше.

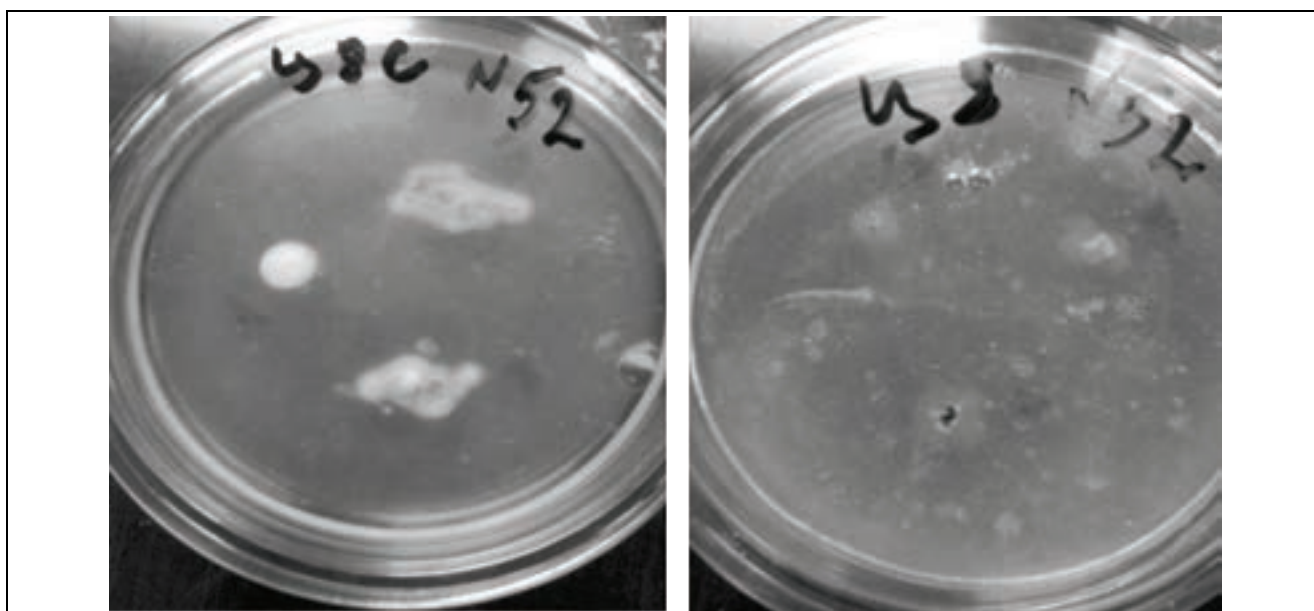


Рис. 2. Рост *A. flavus* F-52 на МЦ-16 с сахарозой (слева) и без нее (справа), 3-и сутки культивирования

Таблица 1. Скорость роста микромицетов (мм/сут) на средах с метилцеллюлозой в присутствии сахарозы

Микромицет	Среда	Время культивирования, сутки				
		3	4	5	6	7
<i>P. martensii</i> F-47	МЦ-16	4,2	5,0	5,0	5,3	5,2
	МЦ-35	3,8	4,7	4,0	4,4	3,9
<i>P. martensii</i> F-63	МЦ-16	5,5	5,5	5,8	6,1	5,7
	МЦ-35	4,6	5,3	5,0	5,5	4,9
<i>A. mangini</i> F-30	МЦ-16	4,4	4,1	3,8	3,6	4,1
	МЦ-35	3,8	3,9	4,0	4,0	3,7
<i>P. citrinum</i> F-54	МЦ-16	4,2	4,5	4,2	3,9	4,3
	МЦ-35	4,3	4,1	4,2	3,9	4,2
<i>C. cladosporioides</i> F-35	МЦ-16	3,6	3,6	3,5	3,5	3,7
	МЦ-35	4,9	4,4	3,9	3,5	4,0
<i>A. flavus</i> F-52	МЦ-16	5,1	4,7	4,4	4,2	4,0
	МЦ-35	2,9	2,8	2,8	2,8	2,7

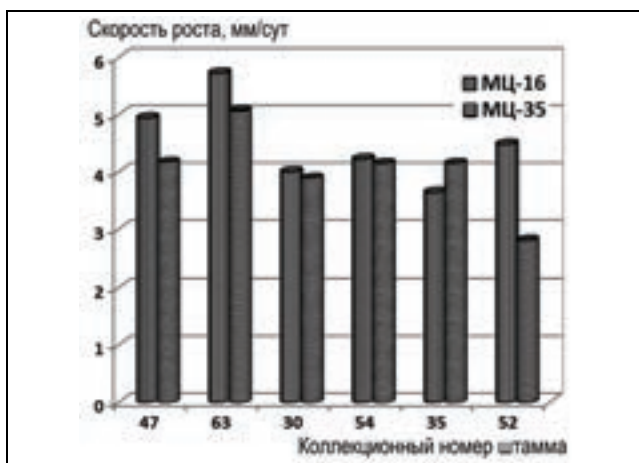


Рис. 3. Средняя радиальная скорость роста микромицетов на средах с метилцеллюлозой с добавлением сахарозы

Наряду с такими параметрами роста микроорганизмов, как радиальная скорость роста 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 протеиназ. В связи с этим на следующем этапе исследования были рассчитаны индексы лизиса микромицетов при росте на средах, содержащих целлюлозу.

У четырех из шести исследованных микромицетов зоны лизиса появились на 7-е сутки культивирования, и только у *P. martensii* F-63 и

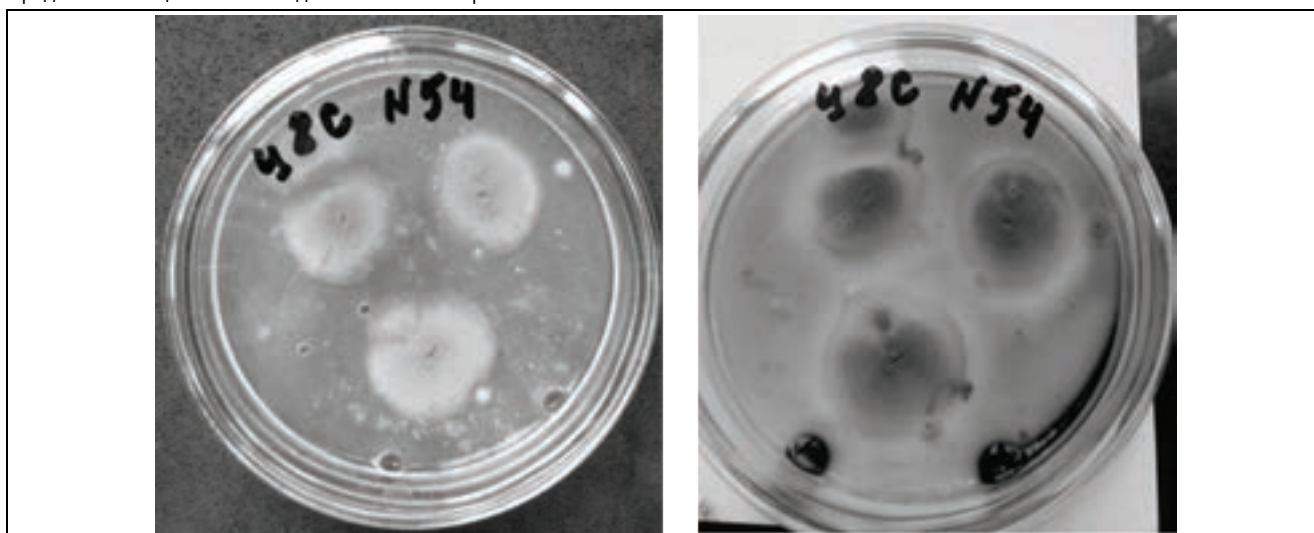


Рис. 4. Рост *P. citrinum* F-54 на среде с МЦ-16 с сахарозой без окраски (слева) и с окраской раствором Люголя (справа), 7-е сутки культивирования

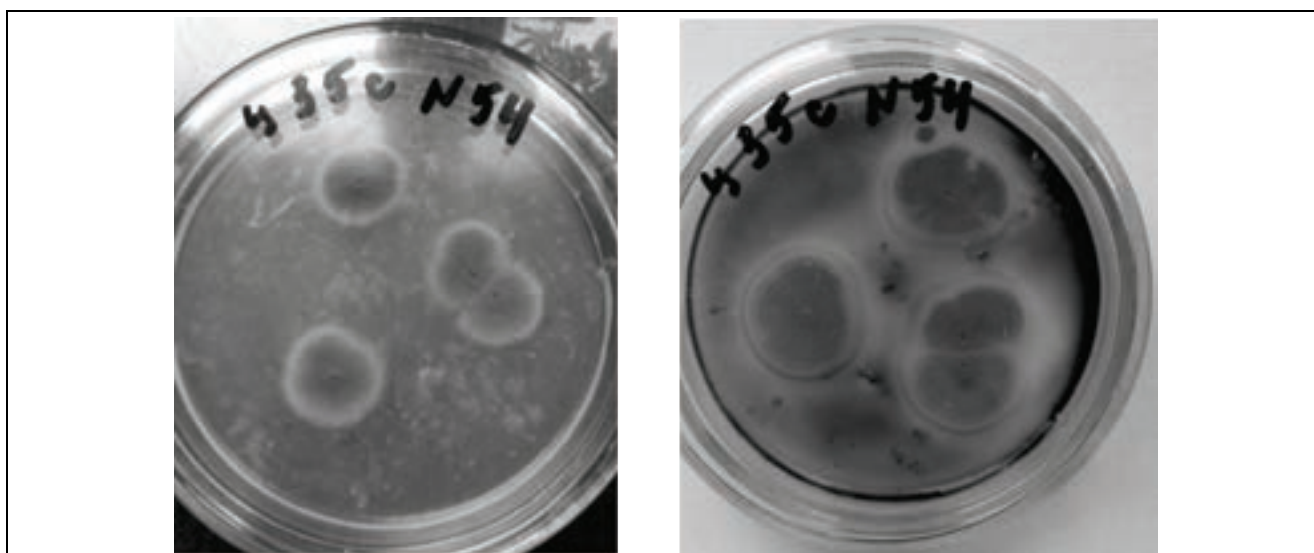


Рис. 5. Рост *P. citrinum* F-54 на среде с МЦ-35 с сахарозой без окраски (слева) и с окраской раствором Люголя (справа), 7-е сутки культивирования

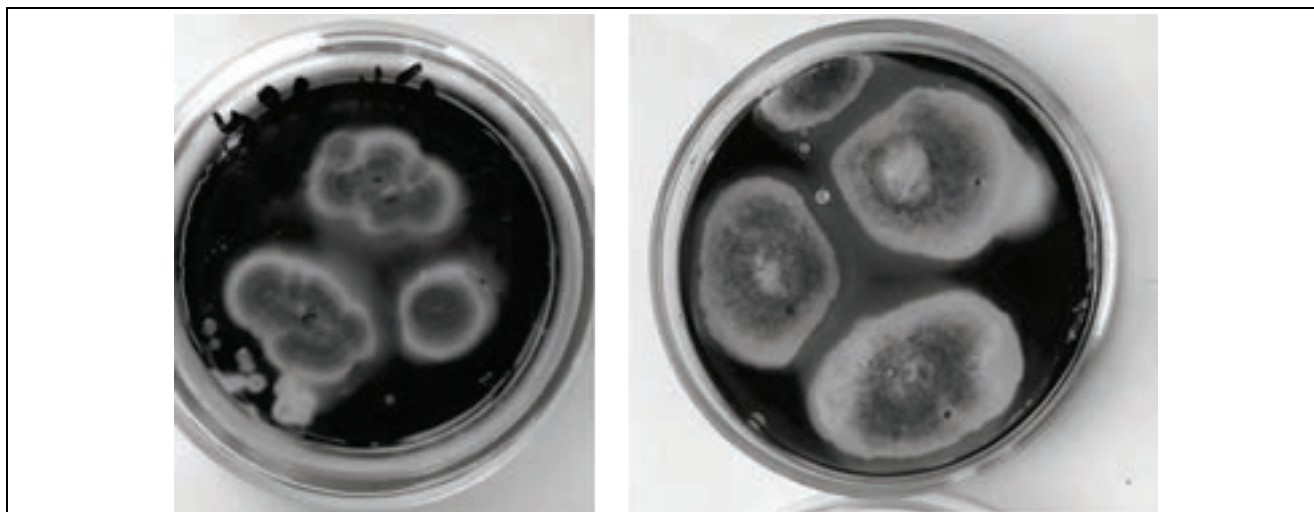


Рис. 6. Рост *A. flavus* F-52 (слева) и *P. martensii* F-63 (справа) на среде с МЦ-16 с сахарозой, окраска раствором Люголя, 7-е сутки культивирования

A. mangini F-30 зоны просветления среды фиксировались, начиная с шестых суток. Для лучшей визуализации зон просветления на последнем этапе культивирования проводилось окрашивание сред раствором Люголя (рис. 4–6). После окрашивания зоны лизиса видны как обесцвеченные области вокруг колоний на ярком желто-коричневом фоне.

Индексы лизиса шести исследованных грибов лежали в диапазоне от 1,13 до 1,55 (рис. 6). Наибольшие индексы лизиса отмечены у *P. citrinum* F-54 как на среде с МЦ-16, так и на среде МЦ-35. Минимальные индексы зафиксированы у *P. Martensii* F-47 на обеих средах. Однако у нового адаптированного штамма F-63 этой культуры индексы лизиса были выше, чем у исходного штамма и только на 23% (МЦ-16) и 14% (МЦ-35) ниже, чем у *P. citrinum* F-54.

На заключительном этапе работы было проведено пилотное глубинное культивирование микромицета *P. citrinum*. Показано, что в первые трое суток в культуральной жидкости постепенно снижается концентрация сахарозы и не обнаруживается какой-либо целлюлазной активности (табл. 2). На дальнейших этапах культивирования после исчерпания легко усвояемого углевода проведенный анализ фильтратов культуральной жидкости выявил наличие гидролитической активности по отношению к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ).

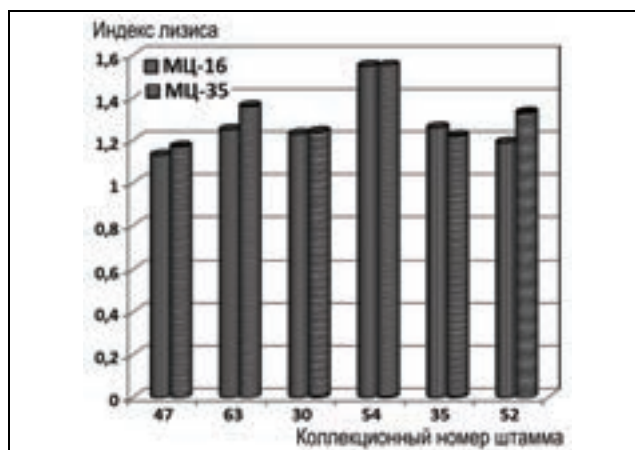


Рис. 7. Индексы лизиса микромицетов при культивировании на средах с метилцеллюлозой, 7-е сутки

Таблица 2. Концентрация сахарозы и образование восстанавливающих сахаров (ВС) после гидролиза МКЦ фильтратами культуральной жидкости на различных этапах культивирования *P. citrinum*

Время, сутки	Сахароза, мг/мл	ВС, мкг/мл
0	5,00±0,48	0
1	1,22±0,14	0
2	0,46±0,52	0
3	0	92±11
4	ин	174±21
5	ин	140±16

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об индуцибельном характере синтеза целлюлаз у *P. citrinum*, т.е. синтезе ферментов в ответ на введение целлюлозосодержащего материала и после истощения других энергетических источников. Подобные закономерности были обнаружены и при изучении особенностей синтеза протеиназ у данного микромицета [12].

ВЫВОДЫ

1. Все исследованные микромицеты обладают способностью к росту на средах с целлюлозными субстратами.
2. Добавление небольшого количества сахарозы увеличивает скорость роста мицелиальных грибов на начальных этапах культивирования и не препятствует в дальнейшем синтезу целлюлаз.
3. Проведенное глубинное культивирование подтвердило секрецию целлюлолитических ферментов у *P. citrinum* и позволяет рассматривать этот микромицет в качестве потенциального продуцента целлюлаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Целлюлазы микроорганизмов // Прикладная биохимическая микробиология. 2002. Т. 38. № 4. С. 355–373
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 биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Успехи биологической химии. 2000. Т. 40. С. 205–266.
4. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Структура и механизм действия целлюлолитических ферментов // Биохимия. 2002. Т. 67. № 8. С. 1026–1050.
5. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674–680.
6. Чекушина А.В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Myceliophthora* с увеличенной гидролитической активностью: Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. М. 2013. 23 с.
7. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Сеницын 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.
8. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. Ферментные препараты *Penicillium verrucosum* для биоконверсии растительного сырья – альтернатива коммерческим препаратам, полученных с помощью грибов рода *Trichoderma* // Биотехнология. 2013. № 3. С. 69–80.
9. 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.
10. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ. 1995. 224 с.
11. ОФС. 1.2.3.001915 Определение сахаров спектрофотометрическим методом. / Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. XIII. Т. 1. М. 2015. 1470 с.
12. Никитина З.К., Гордонова И.К. Оптимизация способа получения кератиназы *Penicillium citrinum* путем направленной адаптации культуры и экзогенной регуляции биосинтеза фермента // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 5. С. 32–36.

Поступила 16 апреля 2018 г.

THE ESTIMATION OF MICROMYCETES CELLULOSE ACTIVITY

© 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)

Large stocks of plant biomass, as well as their renewability make it an attractive raw material for obtaining various types of useful products. 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 producing by many microorganisms: micromycetes, aerobic and anaerobic bacteria. Cellulose can be converted enzymatically into glucose for further production of biofuel, amino acids, feed protein, etc. 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. The main aim of this work was the estimation of micromycetes cellulose activity from VILAR biocollection.

Six microorganisms were investigated with the help of surface and submerged cultivation. It was shown that all mushrooms grew on media containing different sources of cellulose. However, in the absence of sucrose in the media, the growth of cultures was

quickly stopped, followed by lysis of colonies. The addition of small amounts of sucrose during cultivation caused a significant increase in the growth rate of micromycetes without impeding the lysis zones formation and consequently the synthesis and secretion of cellulases.

Cultures lysis indices analysis indicators of their cellulase activity found that they differ very slightly, but the highest figure was for *P. citrinum*. In this regard, this micromycete was chosen for deep cultivation, which confirmed the synthesis and secretion of cellulolytic enzymes into the culture fluid. Therefore, this micromycete can be considered as a potential producer of cellulase.

Key words: micromycetes, cellulases, *Penicillium citrinum*.

For citation: Nikitina Z.K., Gordonova I.K. The estimation of micromycetes cellulose activity. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(6):20–26. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-04>

REFERENCES

- Rabinovich M.L., Mel'nik M.S., Bolobova A.V. Cellyulazy mikroorganizmov // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2002. T. 38. № 4. S. 355–373
- Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Kondrashchenko V.I. Teoreticheskie osnovy biotekhnologii drevesnykh kompozitov. Drevesina i razlagayushchie ee gryby. M.: Nauka. 2001. 264 s.
- Rabinovich M. L., Mel'nik M.S. Progress v izuchenii cellyuloliticheskikh fermentov i mekhanizm biodegradatsii vysokouporядochennykh form cellyulozy // Uspekhi biologicheskoy himii. 2000. T. 40. S. 205–266.
- Rabinovich M.L., Mel'nik M.S., Bolobova A.V. Struktura i mekhanizm dejstviya cellyuloliticheskikh fermentov // Biohimiya. 2002. T. 67. № 8. S. 1026–1050.
- Skomarovskij A.A., Markov A.V., Gusakov A.V. Novye cellyulazy dlya vysokoeffektivnogo gidroliza lignocellyuloznoy biomassy // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2006. T. 42. № 6. S. 674–680.
- Chekushina A.V. Cellyuloliticheskie fermentnye preparaty na osnove gribov Trichoderma, Penicillium i Myceliophthora s uvelichennoj gidroliticheskoy aktivnost'yu: Avtoref. diss. ... kand. him. nauk. M. 2013. 23 s.
- Chekushina A.V., Docenko G.S., Kondrat'eva E.G., Sinicyn A.P. Komponentnyj sostav kommercheskikh fermentnykh preparatov, poluchennykh s pomoshch'yu gribov roda Trichoderma i prednaznachennykh dlya biokonversii rastitel'nogo syr'ya // Biotekhnologiya. 2013. № 3. S. 58–68.
- Chekushina A.V., Docenko G.S., Kondrat'eva E.G., Sinicyn A.P. Fermentnye preparaty Penicillium verruculosum dlya biokonversii rastitel'nogo syr'ya – alternativa kommercheskim preparatam, poluchennykh s pomoshch'yu gribov roda Trichoderma // Biotekhnologiya. 2013. № 3. S. 69–80.
- Nikitina Z.K., YAKovleva M.B., Gordonova I.K., Zon Hy CHol Sravnitel'naya ocenka rosta dejteromicetov pri ispol'zovanii razlichnykh beloksoderzhashchih substratov // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2015. № 11. S. 56–59.
- Sinicyn A.P., Gusakov A.V., CHernoglazov V.M. Biokonversiya lignocellyuloznykh materialov. M.: Izd-vo MGU. 1995. 224 s.
- OFS. 1.2.3.001915 Opredelenie saharov spektrofotometricheskim metodom / Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. Izd. XIII. T. 1. M. 2015. 1470 s.
- Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Optimizatsiya sposoba polucheniya keratinazy Penicillium citrinum putem napravlennoj adaptatsii kul'tury i ehkzogennoj regulatsii biosinteza fermenta // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2014. № 5. S. 32–36.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Флакозид (таблетки) (рег. №№ 90/248/3; 90/248/7) – противовирусное и антигепатотоксическое средство, получаемое из листьев бархата амурского и бархата Лавалья (*Phellodéndron amurénse* и *Phellodendron amurense* var. *Lavallei* Spraque). Применяется для лечения вирусных гепатитов.

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечниковой (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru