

УДК 577.15:663.15

**БІОСИНТЕЗ ЕНДОГЛЮКАНАЗИ ТЕРМОТОЛЕРАНТНИМИ  
МІКРОМІЦЕТАМИ ПРИ РОСТІ НА ШТУЧНИХ ТА ПРИРОДНИХ  
ЦЕЛЮЛОЗОВМІСНИХ СУБСТРАТАХ**

*Є.О. ОМЕЛЬЧУК, асистент, В.О. КРАСІНЬКО, кандидат технічних наук  
Національний університет харчових технологій*

*В.Л. АЙЗЕНБЕРГ, С.О. СИРЧИН, кандидати біологічних наук  
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ*

Здійснено аналіз ендоглюканазної активності серед термотолерантних мікроміцетів різних таксономічних груп, які культивували на природних та штучних целюлозовмісних субстратах. Виявлено найбільш активні продуценти целюлолітичних ферментів та найкращі індуктори целюлаз.

*Ключові слова: термотолерантні мікроміцети, целюлолітичні ферменти, ендоглюканаза, целюлозовмісні відходи*

Загальна кількість рослинної біомаси на Землі оцінюється у  $7,2 \cdot 10^{11}$  тонн, основа якої – клітинні стінки, що на 45-70 % складаються з целюлози. Щороку в результаті фотосинтезу утворюється 121,6 млрд тонн сухої рослинної біомаси. Також щороку накопичується 4-5 млрд тонн целюлозовмісних відходів і вторинних продуктів промислової та сільськогосподарської переробки рослин та деревини [6].

Одним із найперспективніших шляхів переробки рослинної біомаси та утилізації целюлозовмісних відходів може стати розробка ефективної технології їх ферментативного гідролізу з подальшою переробкою моно- та дисахаридів, що утворились (глюкоза, ксилоза, целобіоза) в промислово цінні продукти: біогаз, біоетанол, органічні кислоти тощо [8].

Ферментативний гідроліз целюлози здійснюється комплексом ферментів, які різняться між собою субстратною специфічністю. Сукупність цих ферментів отримала назву целюлолітичного ферментного комплексу. Існує

велика кількість різновидів ферментів, що відрізняються між собою за здатністю до адсорбції на поверхні целюлози [9].

Повноцінний комплекс целюлаз складається з чотирьох типів ферментів: ендо- $\beta$ -1,4-глюканази (КФ 3.2.1.4), екзо- $\beta$ -1,4-глюканази або целобіогідролази (КФ 3.2.1.91), екзо- $\beta$ -1,4-глюкозидази (КФ 3.2.1.74), целобіази або  $\beta$ -глюкозидази (КФ 3.2.1.21) [5].

Найефективнішими продуцентами целюлаз є мікроскопічні гриби. Вони мають розвинений секреторний апарат різноманітних гідролітичних ферментів і менше залежать від умов культивування, ніж бактерії-целюлолітики, які характеризуються ще й тим, що їх целюлолітичний комплекс міцно пов'язаний із клітиною продуцента (целюлосома), тому виділити його із культуральної рідини набагато важче, ніж целюлази мікроміцетів [4].

Ферменти термотолерантних та термофільних мікроміцетів характеризуються стійкістю проти екстремальних умов навколишнього середовища, особливо температури, і завдяки цим властивостям їх можна застосовувати в різних галузях промисловості та сільського господарства [1].

Україна має достатні запаси целюлозовмісної сировини – її щорічний енергетичний потенціал становить в середньому 30 млн. тонн, переважаючи більшість з якого це солома злакових культур, відходи переробки кукурудзи (стебла, листя, стрижні початків), первинні та вторинні відходи переробки соняшнику та цукрового буряка (стебла та лушпиння соняшнику, буряковий жом) [2]. Нині в Україні не розвинені технології ферментативного гідролізу целюлози, через те що немає ні ефективного вітчизняного продуцента целюлолітичних ферментів, ні власних технологій їх виробництва. Тому важливим завданням сьогодення є розробка вітчизняних технологій недорогих, але ефективних целюлолітичних ферментних препаратів для різних галузей промисловості та сільського господарства.

**Матеріали і методика досліджень.** Об'єктами дослідження було

дев'ять відібраних у результаті скринінгу термотолерантних колекційних штамів різних видів мікроскопічних грибів із Української колекції мікроміцетів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [7].

Культивування мікроміцетів здійснювали на мінеральному поживному середовищі Чапека за Підоплічко, г/л:  $\text{NaNO}_3$  – 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,  $\text{MgSO}_4$  – 0,5,  $\text{KCl}$  – 0,5,  $\text{FeSO}_4$  – 0,01. Як індуктор та джерело вуглецю використовували такі целюлозовмісні субстрати: вівсяна солома, опале листя дерев, стебла очерету, водорості роду *Zostera*, соняшникове лущиння, стебла та листя соняшнику і кукурудзи, стрижні початків кукурудзи, буряковий жом, деревна тирса. Модельними індукторами були фільтрувальний папір та мікрокристалічна целюлоза.

Культивування проводили в пробірках на качалках за температури 42°C протягом 4 та 6 діб.

Ендоглюканазну активність (СМС) визначали віскозиметричним способом за допомогою віскозиметра ВПЖ-2 (діаметр капіляра 0,99 мм) за здатністю ферменту знижувати в'язкість 0,3%-го розчину натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) з ступенем заміщення 65,3 і ступенем полімеризації 347 [1].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Штами термотолерантних мікроміцетів спочатку перевіряли на здатність до біосинтезу ендоглюканази при рості на субстратах, штучного походження – це фільтрувальному папері та мікрокристалічній целюлозі. Ці субстрати майже на 100% складаються із целюлози та мають постійний склад, тому можуть бути модельними індукторами для порівняння з природними целюлозовмісними субстратами. Дані щодо накопичення ендоглюканазної активності наведено у таблиці.

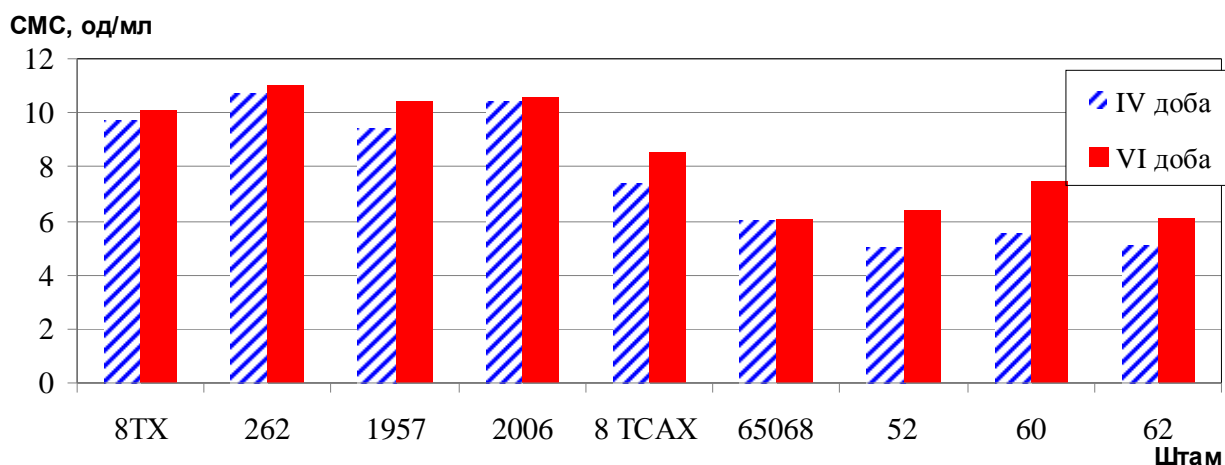
## Динаміка накопичення ендоглюканазної активності (СМС) за умови вирощування мікроміцетів на модельних целюлозовмісних субстратах

Досліджувані мікроміцети	Номер штаму	Ендоглюканазна активність за умови росту на штучному целюлозовмісному субстраті, од/мл			
		Фільтрувальний папір		Мікрокристалічна целюлоза	
		IV доба	VI доба	VI доба	VI доба
<i>Aspergillus sp.</i>	8TX	5,8	6,0	3,8	5,1
	262	9,7	9,7	5,2	7,9
	1957	7,7	8,2	3,7	5,4
<i>Corynascus sp.</i>	2006	7,4	9,3	6,2	6,4
	8 TCAH	5,7	8,1	4,7	6,3
	65068	5,3	6,4	4,2	5,7
<i>Thielavia sp.</i>	52	5,7	5,9	3,5	5,8
	60	4,2	5,8	1,5	5,2
	62	4,7	6,1	2,5	5,7

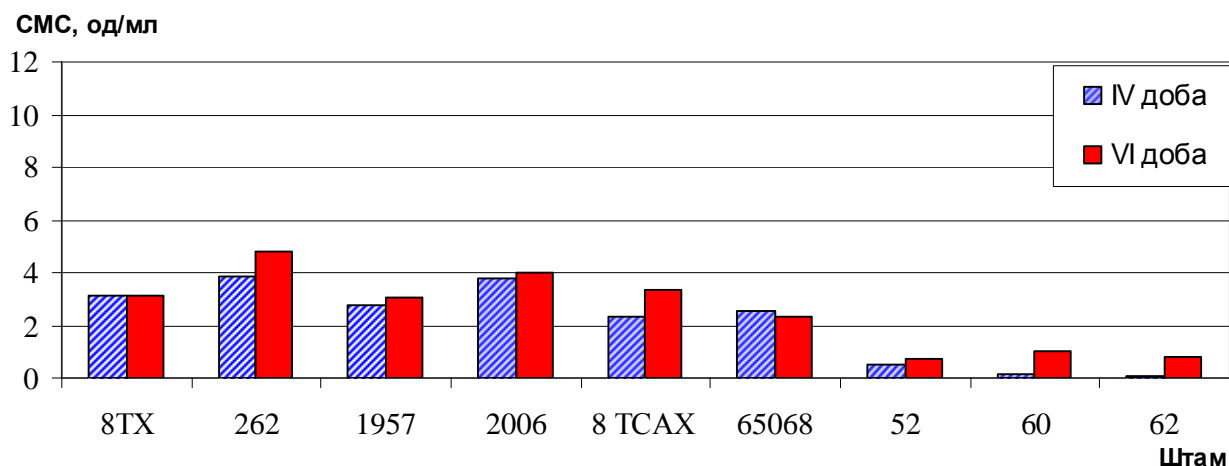
Оскільки целюлоза фільтрувального паперу має значно більшу кількість ділянок аморфної структури, ендоглюканаз діє насамперед саме на аморфні ділянки, то цілком логічним є більша ендоглюканазна активність в культуральній рідині після росту на фільтрувальному папері, ніж після росту на мікрокристалічній целюлозі.

На другому етапі досліджувані мікроміцети культивували на субстратах природного походження, розповсюджених на території України, частина з яких є відходами сільського господарства та переробної промисловості.

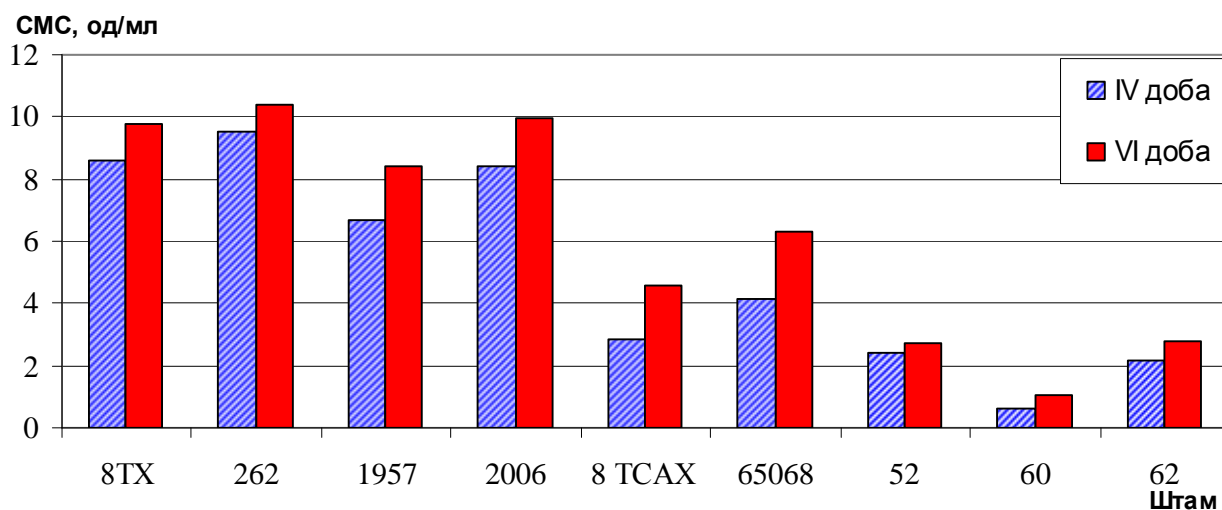
Результати досліджень показані в діаграмах на рисунках 1-10.



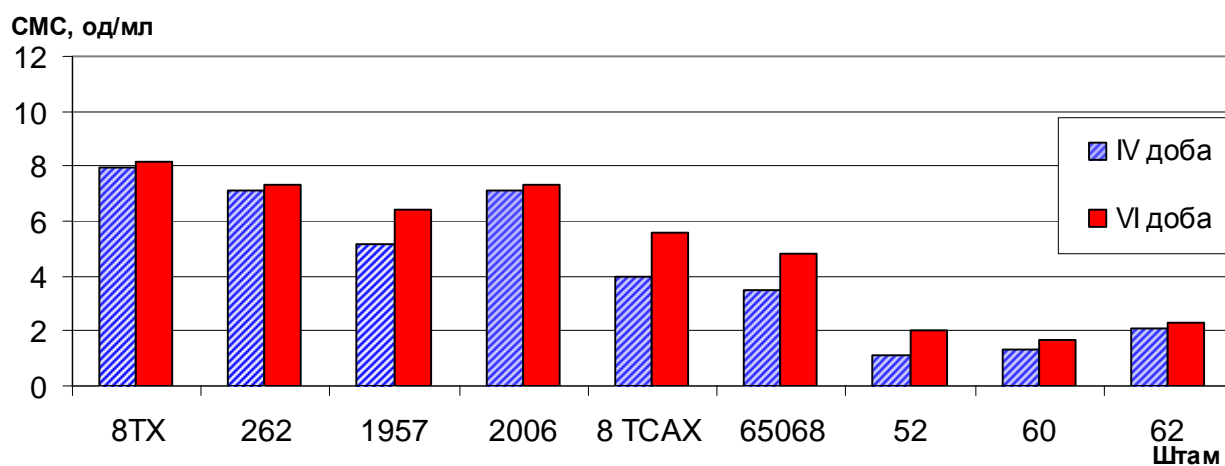
**Рис. 1.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при рості на вівсяній соломі



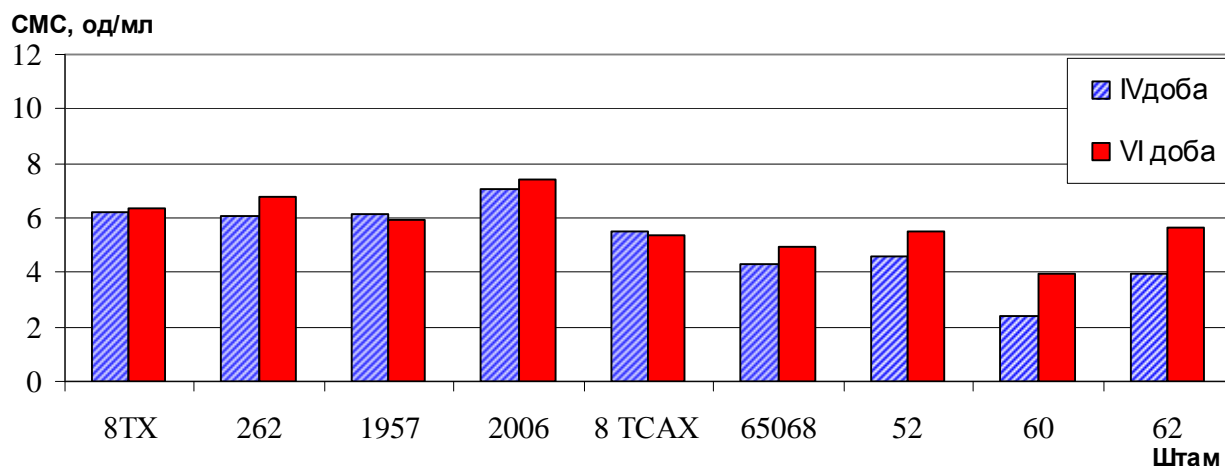
**Рис. 2.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при  
рості на опалому листі



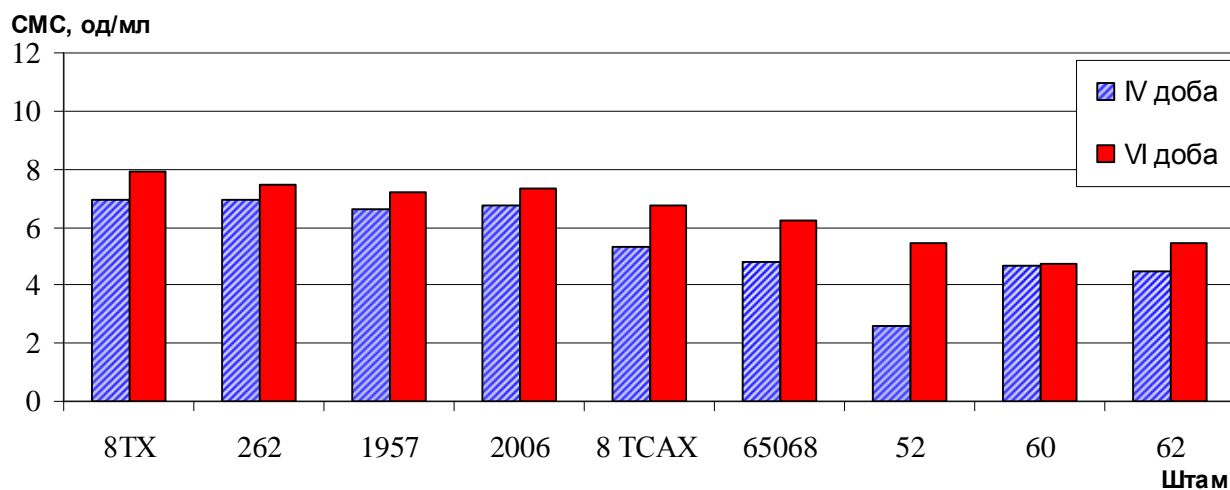
**Рис. 3.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при  
рості на стеблі очерету



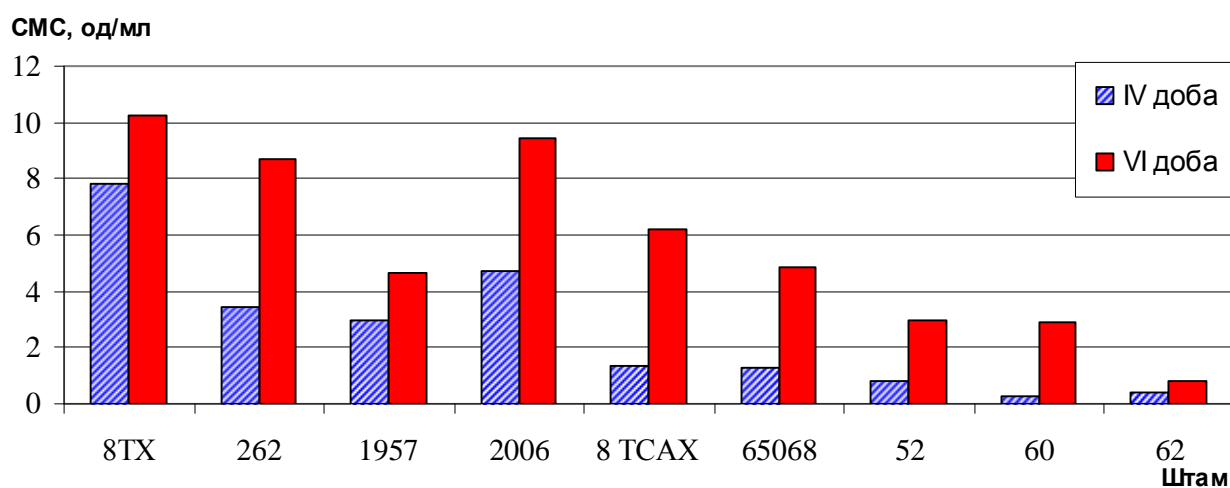
**Рис. 4.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при  
рості на водоростях роду *Zostera*



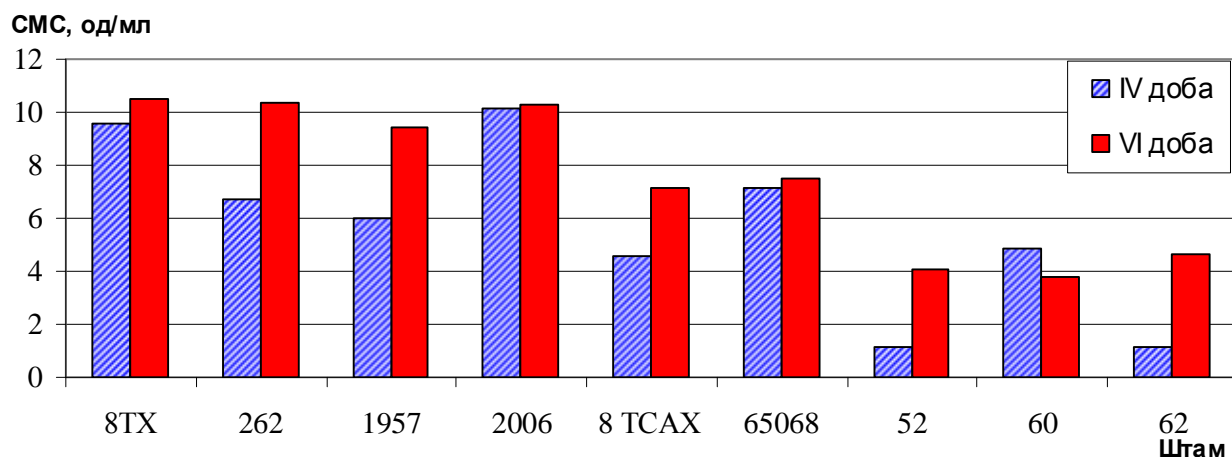
**Рис. 5.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при  
рості на лушпинні соняшнику



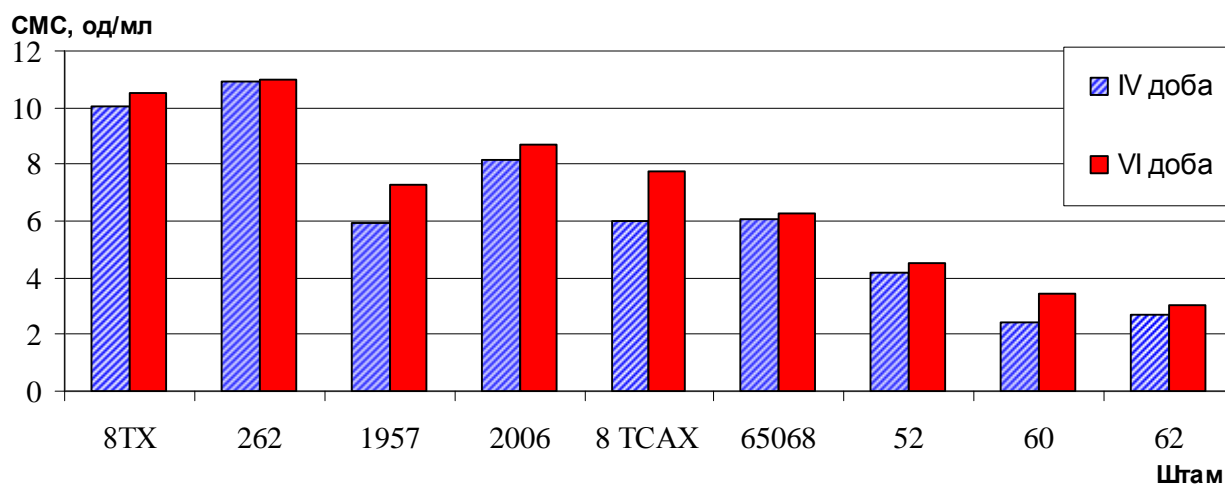
**Рис. 6.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при  
рості на листі та стеблах соняшнику



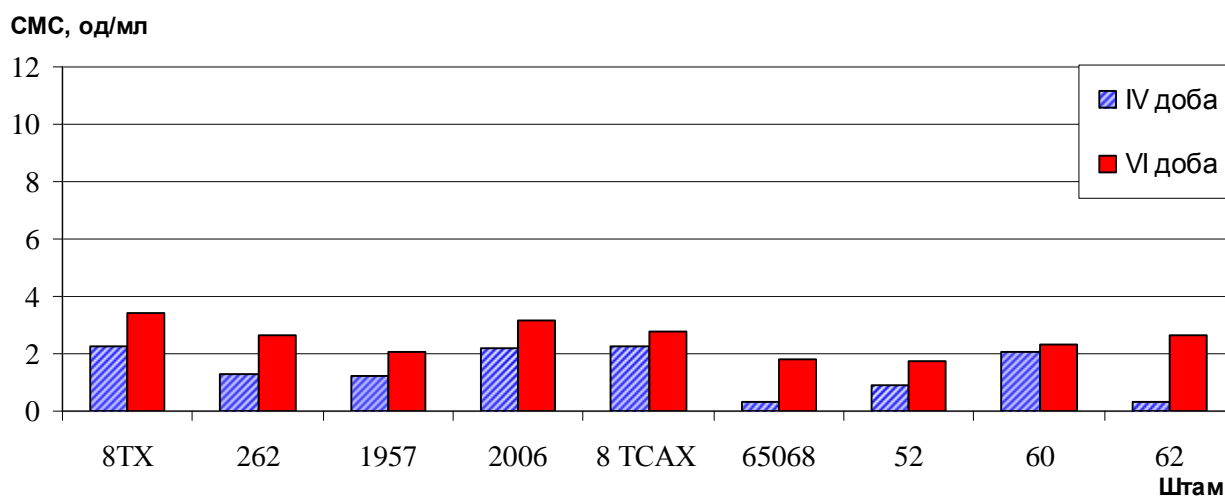
**Рис. 7.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при  
рості на стрижнях початків кукурудзи



**Рис. 8.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при рості на листі та стеблах кукурудзи



**Рис. 9.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів при рості на буряковому жомі



**Рис. 10.** Ендоглюканазна активність досліджуваних мікроміцетів за умови росту на деревній стружці

На основі одержаних даних виявлено найактивні продуценти ендоглюканази. Серед представників роду *Aspergillus* – це штам 262, хоча й два інші представники показали високу ендоглюканазну активність, роду *Corynascus* – це штам 2006. Максимальна ендоглюканазна активність проявлялась у кожного із представників роду *Thielavia* залежно від субстрату, крім цього їх ферментативна активність в більшості випадків порівняно з іншими досліджуваними мікроміцетами була на порядок меншою.

Серед перевірених целюлозовмісних субстратів найкращим індуктором целюлаз для більшості досліджуваних мікроміцетів виявились солома, стебла очерету, стебла та листя кукурудзи й буряковий жом. Це пояснюється доступністю та наявністю значної кількості аморфних ділянок целюлози в цих субстратах, крім того частина целюлози бурякового жому в процесі вилучення сахарози під дією фізичних та хімічних факторів перетворюється з кристалічної в аморфну форму. За умови росту на них найактивні продуценти ендоглюканази проявляли активність понад 10 од/мл *Aspergillus sp.* 262 на соломі та буряковому жому, *Corynascus sp.* 2006 мали ендоглюканазну активність понад 10 од/мл вже на IV добу культивування.

Найменш придатними субстратами для культивування продуцентів целюлолітичних ферментів виявились опале листя та тирса. Це пояснюється незначною кількістю целюлози у опалому листі (10-15%) та високому вмісті лігніну, а отже й важкодоступності целюлози у деревині.

### **Висновки**

Як джерело вуглецю та індуктор целюлолітичних ферментів в умовах промислового виробництва було відібрано солону та буряковий жом, це найкращі оптимальні субстрати для культивування мікроміцетів із целюлозолітичною активністю.

Для розроблення біотехнології одержання целюлолітичних ферментних препаратів відібрані штами *Aspergillus sp.* 262 та *Corynascus sp.* 2006 як ефективні продуценти ендоглюканази.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Билай Т.И.* Термофильные грибы и их ферментативные свойства [Монография] / Т.И. Билай. – К.: Наукова думка, 1985. – 172 с.
2. *Гелетуха Г.Г.* Енергетичний потенціал біомаси в Україні [Електронний ресурс] / Г.Г. Гелетуха, Т.А. Железна, М.М. Жовмір, Ю.Б. Матвеев // Науковий вісник НУБіП України. – 2010. – Вип. 153. – 6 с.– Режим доступу до журн.: <http://elibrary.nubip.edu.ua/8102/1/10ggg.pdf> - Назва з екрану.
3. *Полыгалина Г.В.* Определение активности ферментов [Справочник] / Г.В. Полыгалина, В.С. Чередниченко, Л.В. Римарева. – М.: Делипринт, 2003. – 375 с.
4. *Рабинович М.Л.* Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизм действия / М.Л.Рабинович, В.М.Черноглазов, А.А.Клесов // Биоконверсия целлюлозы: микробиология и биохимия. – М.: ВИНТИ, 1988. – С.8-149. – (т.11. – Итоги науки и техники, Серия «Биотехнология»).
5. *Рабинович М.Л.* Структура и механизм действия целлюлолитических ферментов / М.Л.Рабинович, М.С.Мельник, А.В.Болобова // Биохимия. - 2002. - Т.67, №8. - С. 1026-1050.
6. *Синицын А.П.* Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов [учебное пособие] / А.П.Синицын, А.В.Гусаков, В.М.Черноглазов. - М.: МГУ, 1995. – 224 с.
7. Скринінг продуцентів целюлолітичних ферментів серед мезофільних та термотолерантних мікроміцетів / [Є.О.Омельчук, В.О.Красінько, В.Л.Айзенберг та ін.] // Харчова промисловість. – 2010. – №9. – С. 46–49.
8. *Dashtban, M.* Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives / M.Dashtban, H.Schraft, W.Sin // International Journal of Biological Sciences. - 2009. - V.5. - P.578-595.
9. Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, fonction and enzyme families / [N.R.Gilkes, B.Henrissat, D.G.Kilburn etc.] // Microbiol. Rev. -

1991. - V.55. - P.303-315.

**БИОСИНТЕЗ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫМИ  
МИКРОМИЦЕТАМИ ПРИ РОСТЕ НА ИСККУСТВЕННЫХ И  
ПРИРОДНЫХ ЦЕЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТАХ**

**Омельчук Е.А., Красинько В.О., Айзенберг В.Л., Сырчин С.А.**

Проведен анализ эндоглюканазной активности среди термотолерантных микромицетов разных таксономических групп, которые выращивали на природных и искусственных целлюлозосодержащих субстратах. Выявлены наиболее активные продуценты целлюлолитических ферментов и наиболее эффективные индукторы целлюлаз.

*Ключевые слова: термотолерантные микромицеты, целлюлолитические ферменты, эндоглюканаза, целлюлозосодержащие отходы*

**CELLULASE BIOSYNTHESIS BY TERMOTOLERANT  
MICROMICETES, GROWN IN NATURAL AND SYNTHETIC  
CELLULOSE SUBSTRATES**

**E. Omelchuk, V. Krasinko, V. Aisenberg, S. Syrchin**

The analysis of the endoglucanase activity among termotolerant micromicetes of a different taxonomic groups, grown in natural and synthetic cellulose substrates was carried out. The most active producers of cellulolytic enzymes and the best cellulase inducers were revealed.

*Key words: termotolerant micromicetes, cellulase, endoglucanase, cellulose waste*