

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАЗИДИОМИЦЕТОВ И МИКРОМИЦЕТОВ

*П.Н. Кузьмин, магистрант, Д.В. Володько, 3 курс
Научный руководитель – О.Н. Жук, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет*

Введение. В последние десятилетия грибы уверенно заняли ведущие места в качестве объектов прикладных и фундаментальных исследований во всём мире, во многом благодаря способности продуцировать сложный комплекс внеклеточных окислительных и гидролитических ферментов. Известно более 2000 видов грибов различных таксономических групп способных продуцировать целлюлолитические ферменты, что приводит к разрушению древесины [1, с. 35]. Основными полимерными компонентами клеточных стенок древесины являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин. Биотрансформация лигноцеллюлозы с помощью целлюлолитических ферментов имеет большое фундаментальное и прикладное значение. Целлюлазы широко используются в целлюлозно-бумажной промышленности, в переработке лигноцеллюлозных отходов, с их помощью производят напитки и продукты питания, биотопливо, кормовые добавки, биологические моющие средства и фармацевтические препараты, что позволяет отнести их к важным промышленным ферментам [2, с. 8]. Поиск эффективных продуцентов целлюлаз является актуальной задачей современной биотехнологии [3, с. 4694] [4, с. 221].

Цель настоящей работы – сравнительный анализ целлюлолитической активности грибов различных таксономических групп.

Материалы и методы. В качестве объектов для сравнительного анализа целлюлолитической активности были использованы поверхностные культуры 4 штаммов базидиальных грибов (*Daedaleopsis confragosa*, *Sterium hirsutum*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*) из коллекции УО «Полесский государственный университет» и 5 штаммов аскомицетов (*Alternaria alternata* БИМ F-119, *Fusarium oxysporum* БИМ F-609 Г, *Aspergillus awamori* БИМ F-7, *Aspergillus terreus* БИМ F-107, *Talaromyces funiculosus* БИМ F-15) из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, любезно предоставленных Институтом микробиологии НАН РБ. Культивировали на питательных средах: сусло-агар, картофельно-сахарозный агар, овсяный агар.

Целлюлолитическую активность оценивали методом диффузии красителя [5, с. 503]. Ковёр мицелия базидиальных грибов площадью 1 см² помещали на чашки Петри (d = 90 мм) с КМЦ-агаром (0,2 % NaNO₃, 0,1 % K₂HPO₄, 0,05 % MgSO₄, 0,05 % KCl, 0,2 % Na-КМЦ (DS=1,2), 0,02 % пептон, 1,7 % агар) и инкубировали в термостате при 28±1°C в течение 7 суток. Штаммы микромицетов

высаживали в центр чашек Петри микробиологической петлёй методом точковой инокуляции. В качестве красителя использовали йодный раствор по Граму (2,0 г KI и 1,0 г I₂ на 300 мл дист. H₂O). После инкубации чашки заливали 10 мл йодного раствора по Граму и выдерживали в течение 5 минут. Затем краситель сливали и измеряли диаметр зоны просветления (d_{зоны}) и диаметр зоны роста колонии (d_{колонии}). Целлюлолитическую активность определяли на 3-й, 5-й и 7-й день инкубирования, выражали через относительную целлюлолитическую активность (ОЦА), которая отражает линейную зависимость величины ОЦА с активностью эндоглюканазы среди штаммов грибов [6, с. 6]. ОЦА вычисляли по формуле: [7, с. 44]

$$\text{ОЦА} = d \text{ зоны(мм)}/d \text{ колонии(мм)}$$

Опыт проводили в трёх повторах. Посев микроорганизмов осуществляли в ламинарном боксе для исключения риска контаминации. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы Excel 2019.

Результаты и обсуждение

Колонии грибов на КМЦ-агаре имели паутинистую форму, исключение составили колонии *Sterium hirsutum*, которые имели клочковатое строение. Профиль плоский. Эксудат отсутствовал у всех штаммов. Колонии в большинстве случаев не имели цвета, исключение составили штаммы микромицетов: *Alternaria alternate* БИМ F-119 (чёрный), *Fusarium oxysporum* БИМ F-609 Г (светло-жёлтый) *Aspergillus awamori* БИМ F-7 (чёрный)

Результаты определения целлюлолитической активности поверхностной культуры грибов представлены в таблице.

Таблица – Целлюлолитическая активность поверхностной культуры грибов

Название	ОЦА 3-й день	ОЦА 5-й день	ОЦА 7-й день
Базидиомицеты			
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	1,17±0,22	1,45±0,08	1,94±0,67
<i>Sterium hirsutum</i>	1,15±0,33	0,53±0,11	0,51±0,20
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,09±0,03	0,07±0,03	0,05±0,03
<i>Agaricus bisporus</i>	0	0,02±0,01	0,04±0,02
Микромицеты			
<i>Alternaria alternate</i> БИМ F-119	0,60±0,26	0,42±0,04	0,32±0,09
<i>Fusarium oxysporum</i> БИМ F-609 Г	0	0,04±0,03	0,05±0,02
<i>Aspergillus awamori</i> БИМ F-7	0,55±0,01	0,47±0,03	0,41±0,02
<i>Aspergillus terreus</i> БИМ F-107	0,40±0,06	0,29±0,02	0,25±0,02
<i>Talaromyces funiculosus</i> F-15	1,0±0	1,25±0,37	1,58±0,24

Все исследуемые штаммы оказались способны разрушать КМ-целлюлозу. В наших экспериментах показатели ОЦА различались в зависимости от штамма гриба и времени инкубации. В большинстве случаев она уменьшалась или изменялась незначительно в течение 7 суток инкубации (табл.1). Исключение составили 2 штамма: *Daedaleopsis confragosa* и *Talaromyces funiculosus* БИМ F-15, где ОЦА имела наибольшие показатели, которые составили для аскомицета *T. funiculosus* БИМ F-15 от 1,0±0 (3-й день инкубации) до 1,58±0,24 (7 день инкубации) и от 1,17±0,22 (3-й день инкубации) до 1,94±0,67 (7-й день инкубации) для штамма базидиомицета *D. confragosa*. Считается, что штаммы с ОЦА > 1,50 являются перспективными продуцентами целлюлаз [6, с. 2].

Выводы. В результате проведения сравнительного анализа целлюлолитической активности поверхностной культуры 9 коллекционных штаммов грибов были выявлены 2 штамма наиболее активных грибов, которые могут быть перспективными штаммами-продуцентами. Это штаммы *Daedaleopsis confragosa* и *Talaromyces funiculosus* БИМ F-15. Результаты данного исследования в дальнейшем будут использованы при получении очищенных препаратов целлюлаз.

Список использованных источников

1. Ферментные системы высших базидиомицетов / Н.И. Даниляк [и др.]. – Киев.: Наукова думка, 1989. – 280 с.
2. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective / S. Sajith [etc.] // Journal of Nutrition & Food Sciences. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 1–13.
3. Colonia B.S., Junior A.F. Screening and detection of extracellular cellulases (endo- and exo-glucanases) secreted by filamentous fungi isolated from soils using rapid tests with chromogenic dyes / B.S Colonia, A.F. Junior // African Journal of Biotechnology. – 2014. – Vol. 13, № 52. – P. 4694–4701.
4. Поиск грибных продуцентов целлюлолитических ферментов / И.В. Мороз [и др.] // Труды БГУ. – 2013. – Том 8, часть 1. – С. 221–223.
5. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine / R.C. Kasana [etc.] // Current Microbiology. – 2008. – Vol. 57, № 5. – P. 503–507.
6. Florencio C. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains / C. Florencio, S. Couri, C.S. Farinas // Enzyme Research. – 2012. – Vol. 2012, № 4. – P. 1–7.
7. Aakanchha J. Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology Principles and Technique / J. Aakanchha, J. Richa, J. Sourabh. – NY.: Humana Press, 2020. – 282 p.