

БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ ТЕРМОФИЛЬНЫМИ МИКРОМИЦЕТАМИ

Аннотация

Термофильные микроорганизмы-продуценты целлюлаз привлекают внимание многих исследователей в качестве потенциальных участников многих биотехнологических процессов. В результате проведенных исследований из почвенных образцов выделено 34 штамма термофильных целлюлозоразлагающих микромицетов, относящихся к 12 родам. Установлено, что среди отобранных и изученных термофильных грибов 3 штамма являются активными продуцентами целлюлолитических ферментов и могут быть использованы в биотехнологических процессах при переработке растительных отходов.

Ключевые слова: биоконверсия, растительные отходы, термофильные микромицеты

В настоящее время в свете развития вопросов получения биотоплива отмечается повышенный интерес исследователей к термофильным микроорганизмам-продуцентам целлюлаз. Применение микроорганизмов снижает проблему переработки растительных отходов при значительном уровне деградации целлюлозы. Высокая скорость роста и термостабильность комплекса ферментов дает им преимущество при использовании в промышленных условиях, а также в процессах разложения целлюлозосодержащих субстратов в природе [1-4].

Среди микробного разнообразия широким спектром биосинтеза целлюлолитических ферментов обладают микроскопические грибы. Поэтому поиск и изучение новых активных штаммов целлюлозоразрушающих микромицетов, способных развиваться при высоких температурах, имеют большое практическое значение.

В связи с этим, проведены исследования по выделению из почвенных образцов целлюлозоразрушающих грибов, способных развиваться при высоких температурах и изучению их целлюлолитической активности.

Материалы и методы

Объектами исследований служили микроскопические грибы, выделенные из почвенных образцов, взятых с хлопковых полей Ташкентской области, а также из ризосферы пшеницы и хлопчатника.

Выделение целлюлозоразрушающих грибов из исследуемых образцов проводили:

1. путем непосредственного посева образцов;
2. методом предельных разведений с высевом на поверхность фильтровальной бумаги, увлажненной питательной средой Mandels [5], положенной на стеклянные канюли, помещенные в колбы Эрленмейера, а также на увлажненную фильтровальную бумагу, помещенную на поверхность водного «голодного» агара, предварительно разлитого в чашки Петри.

Посеянные образцы выдерживали при температурах 40, 45, 50 и 55°C.

Для идентификации культур использовали определитель [6].

У выделенных чистых культур грибов определялась способность синтезировать целлюлазы. В качестве питательной среды для скрининга целлюлозоразрушающих микроорганизмов использовали среду Mandels.

Первичный отбор грибов-продуцентов целлюлаз проводили в течение 5 суток на среде Mandels в условиях глубинной ферментации на качалках с числом оборотов 200-220

об/мин при температуре 45°C. Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера. Посевной материал вносили в каждую колбу в виде конидий в количестве 1×10^6 на 1 мл.

При изучении влияния источника углерода в среде на биосинтез целлюлаз отобранными активными штаммами-продуцентами, грибы выращивали на среде Mandels, в которой в качестве источника углерода использовали 2% измельченной фильтровальной бумаги или 2% измельченной пшеничной соломы или 2% измельченных кукурузных кочерыжек или 2% пшеничных отрубей. Определяли активность фермента, гидролизующего хлопковое волокно, и активность фермента, гидролизующего Na КМЦ [7, 8].

Содержание редуцирующих сахаров определяли по методу Сомоджи-Нельсона [9].

Результаты исследований и обсуждение

В результате проведенных исследований из почвенных образцов, взятых с хлопковых полей Ташкентской области и из ризосферы хлопчатника и пшеницы, выделено 34 штамма целлюлозоразлагающих микромицетов, способных развиваться при повышенной температуре и относящихся к родам *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Torula*, *Malbranchea*, *Humicola*, *Rhinochadiopsis*, *Acremonium*, *Ulocladium*, *Sepedoni*. Среди микромицетов ризосферы хлопчатника и пшеницы преобладали термотолерантные формы.

В результате скрининга термофильных микромицетов, обладающих целлюлазной активностью, отобрано 16 штаммов грибов.

Сравнительное изучение выделенных культур по их способности синтезировать целлюлазы проведено на среде Mandels с 2% фильтровальной бумагой в качестве источника углерода. Анализ целлюлолитической активности показал, что все исследованные штаммы грибов обладают способностью образовывать активные целлюлазы (табл.1).

Таблица 1 - Целлюлолитическая активность термофильных грибов при культивировании их на среде Mandels с 2% фильтровальной бумаги

Наименование грибов	Температура культивирования, °С	Экзоклюканазная активность, ед/мл	Эндоглюканазная активность, ед/мл
<i>Mucor michei</i>	45	1,15	3,50
<i>Aspergillus fumigatus</i> 23	45	0,76	2,42
<i>Aspergillus fumigatus</i> 24	45	0,83	1,80
<i>Aspergillus fumigatus</i> 37	45	0,71	1,07
<i>Torula thermophila</i>	45	0,85	2,50
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-1	45	1,12	3,32
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-2	45	1,50	5,64
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-3	45	0,71	1,07
<i>Malbranchea pullchella</i> 3-6	50	0,98	2,17
<i>Malbranchea pullchella</i> 3-7	50	1,10	2,36
<i>Humicola grisea</i>	45	1,26	3,75
<i>Rhinochadiopsis vesiculosa</i>	45	0,62	2,0
<i>Acremonium thermophilum</i>	45	1,10	1,68
<i>Sepedonium lanuginosum</i>	45	0,82	2,0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 247	45	0,96	2,13
<i>Thermomyces</i> sp.250	45	0,98	2,25

Однако, высокой биосинтетической активностью обладали лишь 5 культур микроскопических грибов, а именно *Mucormichei*, *Thermoascus aurantiacus* 1-1, *Thermoascus aurantiacus* 1-2, *Malbranchea pullchella*, *Humicola grisea*, которые были отобраны для дальнейших исследований.

Известно, что целлюлолитические ферменты относятся к числу индуцируемых ферментов. В связи с этим, проведены исследования по изучению влияния различных

целлюлозосодержащих субстратов на биосинтез целлюлолитических ферментов у отобранных культур микромицетов. В качестве источников углерода взяты относительно дешевые растительные субстраты и их продукты (измельченная пшеничная солома, кукурузные кочерыжки и пшеничные отруби).

Выявлено, что при выращивании грибов на взятых для опыта целлюлозосодержащих субстратах наблюдается увеличение целлюлазной активности в сравнении с контрольной средой Mandels с фильтровальной бумагой. Эти субстраты богаты белком, содержат витамины, аминокислоты и другие физиологически активные соединения, и, естественно, представляют собой прекрасную питательную среду для культивирования микроскопических грибов, стимулируя не только рост, но и повышая целлюлазную активность.

Установлено, что эндоглюканазная и экзоглюканазная активности возрастают во всех вариантах опыта. Однако, наиболее доступным субстратом оказались пшеничные отруби, где активность фермента, гидролизующего Na-КМЦ, достигает 8,95-14,0 ед/мл, а активность фермента, гидролизующего хлопковое волокно 3,80-6,13 ед/мл. Несколько ниже была активность культур при выращивании их на среде Mandels с пшеничной соломой и кукурузными кочерыжками (табл.2).

Таблица 2 - Влияние источника углерода на целлюлолитическую активность грибов

Среда Mandels, (солевой состав +)	Экзоглюканазная активность, ед/мл	Эндоглюканазная активность, ед/мл
<i>Mucor michei</i> (45°C)		
+2% фильтровальной бумаги	1,15	3,64
+2% пшеничной соломы	4,21	11,08
+2% кукурузных кочерыжек	3,68	10,64
+2% пшеничных отрубей	5,15	12,40
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-1 (45°C)		
+2% фильтровальной бумаги	1,50	5,64
+2% пшеничной соломы	4,20	9,20
+2% кукурузных кочерыжек	3,62	8,53
+2% пшеничных отрубей	5,44	12,72
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-2 (45°C)		
+2% фильтровальной бумаги	1,57	4,70
+2% пшеничной соломы	4,9	13,44
+2% кукурузных кочерыжек	2,70	12,72
+2% пшеничных отрубей	6,13	14,00
<i>Humicola grisea</i> (45°C)		
+2% фильтровальной бумаги	1,26	3,54
+2% пшеничной соломы	3,80	6,71
+2% кукурузных кочерыжек	2,54	5,10
+2% пшеничных отрубей	4,96	11,05
<i>Malbranchea pullchella</i> (50°C)		
+2% фильтровальной бумаги	1,1	2,36
+2% пшеничной соломы	2,43	7,85
+2% кукурузных кочерыжек	1,55	3,96
+2% пшеничных отрубей	3,80	8,95

Сравнительный анализ эндо- и экзоглюканазной активности показал, что наиболее активными продуцентами целлюлаз на всех исследуемых субстратах являются штаммы *Thermoascus aurantiacus* 1-1, *Thermoascus aurantiacus* 1-2, а также *Mucormichei*. Роль *Thermoascu saurantiacus* как деструктора целлюлозы уже обсуждалась в прошлом [10]. Это удивительно, но было обнаружено, что целлюлолитические ферменты, и особенно целлобиогидролазы, полученные из *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* или *Chaetomium thermophilum*, чрезвычайно активны в гидролизе целлюлозного материала. Кроме целлобиогидролаз эти грибы также содержат эндоглюканазы, бета-

глюкозидазы и ксиланазы, которые очень подходят для деградирования целлюлозного материала. Эти ферменты кинетически весьма эффективны в широком интервале температур, и хотя они имеют высокую активность при высокой температуре, они также весьма эффективны при стандартных температурах гидролиза. Это делает их исключительно хорошо подходящими для различных процессов гидролиза целлюлозных субстратов, проводимых как при традиционных температурах, так и при повышенных температурах.

Таким образом, из почв Ташкентской области выделены термофильные грибы (14 штаммов – растущие при температуре 45°C и 2 штамма *Malbranchea pullchella*– при температуре 50°C). Среди отобранных и изученных термофильных грибов 3 штамма являются активными продуцентами целлюлолитических ферментов и могут быть использованы в биотехнологических процессах переработки растительных отходов, проводимых при высоких температурах.

Литература:

1 Квеситадзе Г.И., Квачадзе Л.Л., Квеситадзе Э.Г. Селекция термофильных микроскопических грибов-продуцентов целлюлаз // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. - Т.33. - С.156-161.

2 Gashe B.A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001 // Journal of Applied Microbiology. – 1992 - P.73.

3 Gilbert M. Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255b // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 1992. - P.34-35.

4 Margaritis A., Merchant R.F. Optimization of fermentation conditions for thermostable cellulase production by *Thielavia terrestris* // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 1986. - Vol.1. - P.3.

5 Mandels M., Parrish P., Reese K.T. Soforose as an inducer of cellulose in *Trichoderma viride* // Bacteriology. – 1962. - Vol.83. - P.400-408.

6 Билай Т.И., Захарченко В.А. Определитель термофильных грибов. - Киев: Наукова думка, 1987. - 112 с.

7 Rabinovich M.L., Klesov A.A., Berezin I.V. Kinetics of action of cellulolytic enzymes. Viscosimetric analysis of kinetics of carboxymethylcellulose hydrolysis // Bioorganic chemistry. – 1977. - Vol.3. - P.405-414.

8 Leisola M., Linko M. Determination of cellulases with eyed substrates // Anal. Biochem. – 1976. - Vol.70. - P.102.

9 Somogyi M.J. Notes on sugar determination // J. Biol. Chem. – 1952. - Vol.195. - P.19-23.

10 Патент РФ № 2458128 Способ обработки целлюлозного материала и используемые в нем ферменты / Вехмаанперя Я., Алапуранен М., Пуранен Т. - 15.12.2006.

Түйін

Ж.Ж.ТАШПУЛАТОВ, Т.С.ШУЛЬМАН, М.С.БАХТИЕРОВА, Л.И.ЗАЙНИТДИНОВА

Микробиология институты ӨзР ҒА, Ташкент

ӨСІМДІК ҚАЛДЫҚТАРЫН ТЕРМОФИЛЬДІ МИКРОМИЦЕТТЕРМЕН БИОКОНВЕРСИЯЛАУ

Жүргізілген зерттеу жұмыстарының нәтижесінде топырақ үлгілерінен 12 тұқымға жататын целлюлозаны ыдыратын термофильді микромицеттердің 34 штамдары бөлініп алынды. Барлық зерттелген саңырауқұлақтардың штамдары, әртүрлі өсімдік шаруашылығының қалдықтарын қорек ретінде пайдаланып, кешенді целлюлозалық ферментті өндіре алатын белгі бір қасиеттерге ие екендігі анықталды. Таңдалынып алынған және зерттелген термофильді саңырауқұлақтардың ішінен целлюлолитикалық ферменттердің продуценті ретінде 3 штамм анағұрлым белсенді болып табылды және өсімдік қалдықтарын қайта өңдеу үшін пайдаланылуы мүмкін.

BIOCONVERSION OF PLANT WASTE BY THERMOPHILIC MICROMYCETES

Summary

Thermophilic microorganisms-producers of cellulases attract attention of many researchers as potential agents of many biotechnological processes. As result of conducted study 34 strains of thermophilic cellulose degrading micromycetes representing 12 genera were isolated from soil samples. It was established that among selected and studied thermophilic fungi three strains are active producers of cellulolytic enzymes and may be used in biotechnological processes at bioconversion of plant waste.

Key words: Bioconversion, thermophilic micromycetes

Thermophilic microorganisms-producers of cellulases attract special attention due to raising interest to biofuel production now. Application of microorganisms reduces cost of conversion of plant waste at considerable level of cellulose degradation. High velocity of growth and thermostability of enzymatic complex secure their advantage at application in industrial conditions and in process of degradation of cellulose substrate in environmental conditions as well [1-4].

Filamentous fungi represent wide spectrum of biosynthesis of cellulolytic enzymes among microorganisms. That is why search and study of new active strains of cellulose degrading micromycetes capable to grow and develop at higher temperature possess special practical importance.

In these regards, we conducted study on isolation of cellulose degrading fungi from soil samples, which are capable to grow and develop at higher temperature, and on determination of their cellulolytic activity.

Materials and methods

The object of study were filamentous fungi isolated from soil samples collected on cotton producing fields of Tashkent region and from rhizosphere of cotton and wheat plants.

Isolation of cellulose degrading fungi from collected soils samples was conducted by:

1. method of direct sample cultivation;

2. method of limiting dilution culture with cultivation on surface of filter paper humidified with Mandels nutrient media [5] placed on glass cannulas in Erlenmeyer flasks, and also on surface of humidified filter paper placed on starvation agar preliminarily poured on Petri dishes.

Sowed samples were incubated at t 40, 45, 50 and 55°C.

Cultures were identified with aid of guiding book [6].

Isolated purified fungal cultures were evaluated for ability to synthesize cellulases. Mandels medium was used as nutrient medium for screening of cellulose degrading microorganisms.

Preliminary selection of fungi-producers of cellulases was conducted on 5th day of cultivation on Mandels medium in conditions of submerged fermentation on rotary shakers (200-220 rpm at t 45°C). Cultivation was conducted in Erlenmeyer flasks. Sowing material was added to each flasks in form of conidia (1×10^6 per 1 ml).

At study of impact of carbon source in medium on cellulases' biosynthesis by selected active strains-producers the fungi were cultivated on Mandels medium, which contained as a source of carbon either 2% of grind filter paper or 2% of grind wheat straw or 2% grind corn stalks or 2% of wheat bran. Activity of enzyme hydrolyzing cotton fiber and activity of enzyme hydrolyzing Na-CMC was determined [7, 8].

Content of reducing sugars was determined by method of Somogyi-Nelson [9].

Results of study and discussion

As result of conducted study from soil samples collected on cotton producing fields of Tashkent region and from rhizosphere of cotton and wheat plants 34 strains of cellulose degrading micromycetes were isolated, which were capable to grow and develop at higher temperature. They belong to genera *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Torula*, *Malbranchea*, *Humicola*, *Rhinochadiopsis*, *Acremonium*, *Ulocladium*, *Sepedoni*. Thermotolerant forms were prevailing among micromycetes inhabiting rhizosphere of cotton and wheat.

As result of screening among thermophilic micromycetes possessing cellulolytic activity 16 fungal strains were selected.

Comparative study of isolated cultures on their ability to synthesize cellulases was conducted on Mandels medium with 2% filter paper as carbon source. Analysis of cellulolytic activity revealed that all studied fungal strains possess ability to produce active cellulases (table 1).

Table 1 - Cellulolytic activity of thermophilic fungi at cultivation on Mandels medium with 2% filter paper

Fungi	Cultivation temperature, °C	Exoglucanase activity, U/ml	Endoglucanase activity, U/ml
<i>Mucor michei</i>	45	1.15	3.50
<i>Aspergillus fumigatus</i> 23	45	0.76	2.42
<i>Aspergillus fumigatus</i> 24	45	0.83	1.80
<i>Aspergillus fumigatus</i> 37	45	0.71	1.07
<i>Torula thermophila</i>	45	0.85	2.50
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-1	45	1.12	3.32
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-2	45	1.50	5.64
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 1-3	45	0.71	1.07
<i>Malbranchea pullchella</i> 3-6	50	0.98	2.17
<i>Malbranchea pullchella</i> 3-7	50	1.10	2.36
<i>Humicola grisea</i>	45	1.26	3.75
<i>Rhinochadiopsis vesiculosa</i>	45	0.62	2.0
<i>Acremonium thermophilum</i>	45	1.10	1.68
<i>Sepedonium lanugenosum</i>	45	0.82	2.0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 247	45	0.96	2.13
<i>Thermomyces</i> sp.250	45	0.98	2.25

But, only 5 cultures of filamentous fungi possessed high biosynthetic activity (*Mucor michei*, *Thermoascus aurantiacus* 1-1, *Thermoascus aurantiacus* 1-2, *Malbranchea pullchella*, *Humicola grisea*), which were selected for further study.

It is known that cellulolytic enzymes are considered as induced enzymes. In these regards, study on impact of different cellulose containing substrates on biosynthesis of cellulolytic enzymes at selected fungal strains was conducted. Relatively cheap plant substrates and their products were tested as carbon source (wheat straw, corn stalks and wheat bran).

It was established that at cultivation of fungi on selected cellulose containing substrates an increase of cellulase activity is observed at comparison to control Mandels medium with filter paper. These substrates are rich in protein, contain vitamins, aminoacids and other physiologically active compounds, and, naturally, are perfect nutrient medium for cultivation of filamentous fungi; they simultaneously stimulate not only growth of fungi but also increase their cellulase activity.

It was determined that endoglucanase and exoglucanase activity increase in all variants of test. But, the most digestible substrate was wheat bran: activity of enzyme hydrolyzing Na-CMC was 8.95-14.0 U/ml and of enzyme hydrolyzing cotton fiber – 3.80-6.13 U/ml. a bit lower was cellulolytic activity of fungal cultures at cultivation on Mandels medium with wheat straw and corn stalks (table 2).

Table 2 - Impact of carbon source on cellulolytic activity of fungi

Mandels medium, (salts +)	Exoglucanase activity, U/ml	Endoglucanase activity, U/ml
<i>Mucor michei</i> (45°C)		
+2% filter paper	1.15	3.64
+2% wheat straw	4.21	11.08
+2% corn stalks	3.68	10.64
+2% wheat bran	5.15	12.40
<i>Thermoascus aurantiacus 1-1</i> (45°C)		
+2% filter paper	1.50	5.64
+2% wheat straw	4.20	9.20
+2% corn stalks	3.62	8.53
+2% wheat bran	5.44	12.72
<i>Thermoascus aurantiacus 1-2</i> (45°C)		
+2% filter paper	1.57	4.70
+2% wheat straw	4.9	13.44
+2% corn stalks	2.70	12.72
+2% wheat bran	6.13	14.00
<i>Humicola grisea</i> (45°C)		
+2% filter paper	1.26	3.54
+2% wheat straw	3.80	6.71
+2% corn stalks	2.54	5.10
+2% wheat bran	4.96	11.05
<i>Malbranchea pullchella</i> (50°C)		
+2% filter paper	1.1	2.36
+2% wheat straw	2.43	7.85
+2% corn stalks	1.55	3.96
+2% wheat bran	3.80	8.95

Comparative analysis of endo- and exo-glucanase activity revealed that the most active producers of cellulases on all tested substrates are strains *Thermoascus aurantiacus 1-1*, *Thermoascus aurantiacus 1-2*, and *Mucor michei*. Role of *Thermoascus aurantiacus* as destructor of cellulose was discussed in the past [10]. It is surprising, but it was established that cellulolytic enzymes, and especially cellobiohydrolases, obtained from *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* or *Chaetomium thermophilum*, are extremely active in hydrolysis of cellulose containing matter. Apart of cellobiohydrolases these fungi contain also endoglucanases, beta-glucosidases and xylanases, which are well suited for degradation of cellulose matter. These enzymes kinetically are very effective in wide range of temperature, and though they have high activity at higher temperature, they are very effective at standard temperature of hydrolysis as well. This makes them exceptionally well suited for different processes of hydrolysis of cellulose substrates conducted both at traditional temperatures and at higher temperatures.

Thus, from soils of Tashkent region 16 thermophilic fungi were isolated (14 strains growing at 45°C and 2 strains of *Malbranchea pullchella* growing at 50°C). three strains among selected and studied thermophilic fungi are active producers of cellulolytic enzymes and may be used in biotechnological processes of bioconversion of plant waste conducted at higher temperatures.

References:

- 1 Kvesitadze G.I., Kvachadze L.L., Kvesitadze E.G. Selection of thermophilic microscopic fungi-producers of cellulases // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. – 1997. - Vol.33/ - P.156-161.
- 2 Gashe B.A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001 // Journal of Applied Microbiology/ - 1992/ - P.73.
- 3 Gilbert M. Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255b // Applied Biochemistry and Biotechnology/ - 1992/ - P.34-35.

- 4 Margaritis A., Merchant R.F. Optimization of fermentation conditions for thermostable cellulase production by *Thielavia terrestris* // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 1986. - Vol.1. - P.3.
- 5 Mandels M., Parrish P., Reese K.T. Soforose as an inducer of cellulose in *Trichoderma viride* // Bacteriology. – 1962. - Vol.83. - P.400-408.
- 6 Bilay T.I., Zakharchenko V.A. Guidebook for determination of thermophilic fungi. - Kiev: Naukova dumka, 1987. - 112 p.
- 7 Rabinovich M.L., Klesov A.A., Berezin I.V. Kinetics of action of cellulolytic enzymes. Viscosimetric analysis of kinetics of carboxymethylcellulose hydrolysis // Bioorganic chemistry. – 1977. - Vol.3. - P.405-414.
- 8 Leisola M., Linko M. Determination of cellulases with eyed substrates // Anal. Biochem. – 1976. - Vol.70. - P.102.
- 9 Somogyi M.J. Notes on sugar determination // J. Biol. Chem. – 1952. - . Vol 195. - P.19-23.
- 10 Patent of the Russian Federation № 2458128 Method of treatment of cellulose matter and enzymes used in it / Vekhmanperya Ya., Alapuranen M., Puranen T. - 15.12.2006.