

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭНДОГЛЮКАНАЗ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ КУЛЬТУРАМИ *CELLULOMONAS*

Мордвинова Е.М., Сергеева А.В., Зубов Д.В., Толчёнов А.А.

Московский государственный университет инженерной экологии

Постоянно растет интерес к целлюлозосодержащему сырью, возобновляемые запасы в мире которого почти безграничны. Гидролиз целлюлозы приводит к высвобождению глюкозы, которую можно использовать для получения различных продуктов биотехнологии, в том числе для производства пищевых и кормовых белковых препаратов.

Целлюлоза – очень сложный субстрат для воздействия ферментов. Ферментативная декструкция целлюлозы происходит под действием не отдельных целлюлолитических ферментов, а ферментных комплексов. Определение активности целлюлолитических ферментов затруднено из-за перекрывающейся субстратной специфичности компонентов целлюлазного комплекса. Более того, компоненты целлюлазного комплекса усиливают действие друг друга при воздействии на лигнинцеллюлозные субстраты. Определению активности целлюлаз уделяется большое внимание, продолжается поиск новых общих и селективных методов их детекции, поиск ингибиторов и субстратов, исходя из их субстратной специфичности [1].

Важнейшая роль в деструкции целлюлозы принадлежит эндоглиюканазам. В большинстве случаев активность эндоглиюканаз определяют по воздействию на карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) и выражают в относительных единицах. Методы определения целлюлаз в клонах при расसेве культуры-продуцента на отдельные колонии имеют значение для скрининга продуцентов целлюлазного комплекса, селекции по признаку активности эндоглиюканаз, выявления изоферментов в ходе биосинтеза и фракционирования целлюлаз.

Одним из наиболее распространенным является метод, основанный на том, что взаимодействие красителя конго-красного с полисахаридом, содержащим связи $\beta(1.4)$ или $\beta(1.3)$ дает комплекс насыщенного красного цвета, образование которого предотвращается действием β -глиюканаз. Низкомолекулярные продукты гидролиза КМЦ образуют неокрашенный комплекс с красителем конго красным, из-за чего в месте локализации фермента после проявления в агаризованной среде, образуется зона просветления, хорошо различимая на красном фоне [2]. При использовании этого метода, важно учитывать тот фактор, что некоторые компоненты питательной могут оказывать положительное воздействие на формирование зоны просветления, что приводит к возникновению погрешности при тестировании эндоглиюканазной активности [2]. Поэтому перед определением ферментной активности тестируемой культуры необходимо убедиться в отсутствии факторов, влияющих на образование зон просветления. В результате проведенных экспериментов для выращивания *Cellulomonas* с целью определения целлюлолитической

активности была установлена питательная среда, состава (г/л): микрокристаллическая целлюлоза - 10; K_2HPO_4 - 1; $NaNO_3$ - 1; KCl - 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5, которая не оказывает влияние на результат определения эндоглюканазной активности методом с красителем конго-красным.

При разработке данного метода были установлены доза супернатанта культуральной жидкости, закапываемая в лунки, кислотность агаризованной среды с Na-КМЦ, температура диффузии, время диффузии, время инкубирования культуры *Cellulomonas* на среде с микрокристаллической целлюлозой. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

Первоначально было установлено время накопления максимальной активности целлюлолитического фермента культуры при росте в подобранной питательной среде. Для этого, после 3, 4 и 5 суток ферментации отбирали культуральную жидкость, центрифугировали при 7 °С, а супернатант в количестве 200 мкл закапывали в лунки в агаризованной среде с Na-КМЦ с различной кислотностью для установления оптимального значения рН активности фермента. Величину показателя рН среды варьировали – от 5,8 до 7,0.

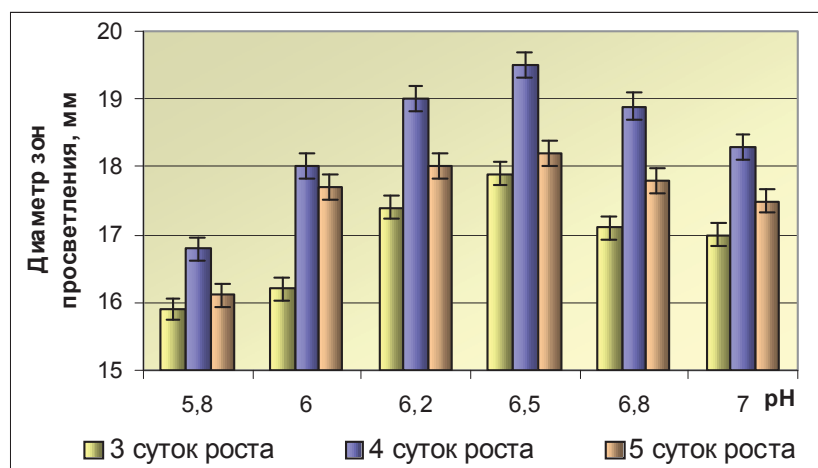


Рис.1. Зависимость диаметра зон просветления от кислотности агаризованной среды для культуры разного возраста.

Из рисунка 1 видно, что кислотность агаризованной среды для тестирования активности целлюлолитических ферментов должна быть в области рН=6,5. Полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными (3,4), т.к. известно, что эндоглюкаказы наиболее активны в области рН=6,5. Также установлено, что максимальные зоны просветления наблюдаются в 4-х суточной культуре.

Было установлено, что при инкубировании чашек с агаризованной средой в термостате в течение 16-18 часов наибольшие зоны просветления образуются при температуре 37 °С (см. рис.2).

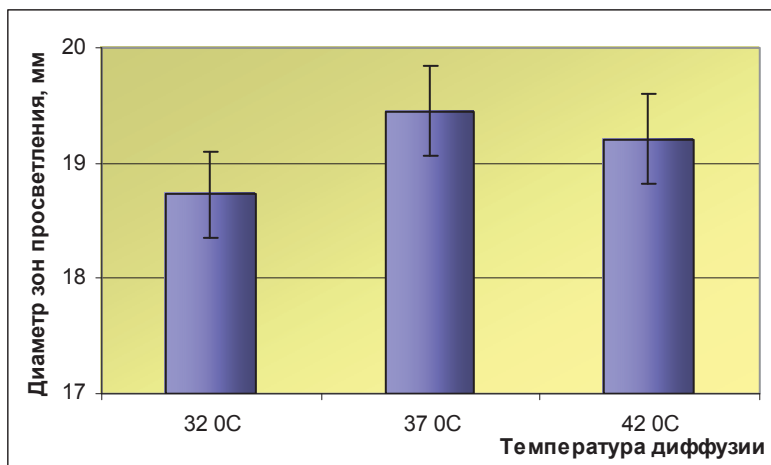


Рис.2. Зависимость величины зон просветления от температуры диффузии.

При разработке данного метода все вышеописанные параметры подбирались и оптимизировались на чашках Петри с агаризованной средой с Na-КМЦ. Как видно на рисунке 3а, на чашках Петри можно тестировать одновременно не более 5 вариантов. Поэтому для проверки большего количества вариантов чашки были заменены на стерильные лотки фирмы «CORNING» размером 230×230 мм, см. рис.15б. Объем агаризованной среды, необходимый для обеспечения высоты лунки 6-7 мм, составил 300мл на такой лоток. С помощью лотков можно одновременно анализировать до 60 вариантов.



а)



б)

Рис.3. Определение целлюлолитической активности по величине зон просветления: а) - на чашках Петри; б) - на лотках.

Таким образом, был предложен модернизированный метод определения целлюлолитической активности у культуры *Cellulomonas* и выбраны следующие параметры проведения анализа:

1. Для культивирования штаммов *Cellulomonas* предложена питательная среда, состава (г/л): целлюлоза - 10; K_2HPO_4 - 1; $NaNO_3$ - 1; K_2HPO_4 - 1; KCl - 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5.
2. Время культивирования *Cellulomonas* в колбах на качалке составляет 4 суток при $t=30 \pm 1^\circ C$;
3. Оптимальное значение рН агаризованной среды с Na-КМЦ составляет 6,5. Среда готовится на фосфатном буфере; доза культуральной жидкости и стандартных растворов, закапываемых в лунки, составляет 200 мкл; диффузия проводится в термостате при температуре $37^\circ C$; время диффузии составляет 16-18 часов;
4. Использование пластиковых лотков позволяет анализировать одновременно большое количество вариантов (до 57 вариантов).

1. Синицын А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / А.П. Синицын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов. – Учебное пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995.- с. 127.

2. Teather R.M., Wood P.J. Use of Congo red –polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen //Appl.Environ.Microbiol.1982.Vol.43.P.777-780.

3.Malek, M.A. Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials./ M.A. Malek, N.A. Chowdhury, Q.M. Yousuf, N. Choudhury // Enzyme Microbiol. Technol.-1988.-V.10.-P.750-753.

4. Immanuel, G. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. / G. Immanuel, R. Dhanusha, P. Prema, A. Palavesam. // Int. J. Environ. Sci. Tech.- 2006.- V. 3(1).- P. 25-34.