

результаты полностью коррелируют с результатами, полученными при росте монокультур и ассоциаций микроорганизмов на среде с 30% содержанием нефти.

Таким образом, сконструированы 4 активные микробные ассоциации на основе одной коллекционной и 2 аборигенных культур микроорганизмов, обладающих высокой нефтеокисляющей и эмульгирующей активностями. Для дальнейших полевых ремедиационных работ рекомендованы 2 ассоциации, состоящих из 2-х культур - *Ps. ssp.*БШС-1:*Ps.aeruginosa H14*; и состоящая из 3-х культур микроорганизмов – *Ps. ssp.*3Г-2:БШС-1:*Ps. aeruginosa H14*.

Литература

- 1 Королев В.А. Очистка грунтов от загрязнений. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 365 с.
- 2 Информационно-аналитический отчет по контрольной и правоприменительной деятельности Актобинской экологической инспекции за 2010 год / Министерство охраны окружающей среды Республики Казахстан. Тобыл-Торгайский департамент экологии. – Актобе, 2010. – 200 с.
- 3 Ягафарова Г.Г. Инженерная экология в нефтегазовом комплексе. – Уфа: Изд. УГНТУ, 2007. – 334 с.
- 4 Рекомендации по использованию биопрепарата «Деворойл» для очистки объектов железнодорожного транспорта от загрязнения нефтепродуктами. – Москва: Мир, 1999. - 21 с.
- 5 Сапарбекова А.А., Исаева А.У., Куатбеков А.М., Илялетдинов А.Н. Использование микроорганизмов для биорекультивации нефтезагрязненных земель на территории Южно-Казахстанской области // Известия МОН РК НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2001. - №6. – С. 14-19.
- 6 Jaysree R.C., Subham B., Priyanka P.S. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples // Pharmacologyonline. – 2011. – P. 1427-1433.
- 7 Palashpriya D., Soumen M., Ramkrishna S. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium // Bioresource Technology. – 2009. - P. 1015-1019.
- 8 Person A., Molin G. Capacity for biosurfactant production of environmental Pseudomonas and Vibronaceae growing on carbohydrates // Appl.Microbiol. and Biotechnol. – 1987. – V. 26. - N5. – P. 439-442.

УДК 547.458.81:577.15:576.85:547.455.623

С.Г Каманова*, Д.Б Тоймбаева., Н.Л. Нечай, Г.Х. Оспанкулова

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт переработки сельскохозяйственной продукции»,

г. Астана, Казахстан

*e-mail: kamanovaveta@mail.ru

Усиление целлюлозолитической активности штаммов продуцентов целлюлаз и β-глюканаз

В данной работе изучалось влияние комплексного воздействия химических и физических мутагенов на штаммы-продуценты целлюлаз и β-глюканаз с целью усиления целлюлозолитической активности. В результате проведенных исследований сделано следующее заключение: проведение комплексного поэтапного воздействия химическим мутагеном, УФ-облучением и дробным рентгеновским облучением является эффективным для получения мутантных штаммов с высокой целлюлозолитической активностью.

Ключевые слова: Штаммы-продуценты, химический мутагенез, УФ, рентген, облучение, целлюлозолитическая активность.

S.G. Kamanova., D.B. Toymbaeva., N.L. Nechay, G.H. Ospankulova

Целлюлаза және β-глюканаза штамм продуценттерінің целлюлозалитикалық белсенділігін арттыру

Берілген жұмыста целлюлаза және β-глюканаза штамм продуценттерінің целлюлозалитикалық белсенділігін арттыру мақсатында химиялық және физикалық мутагендердің құрылымдық әсері зерттелген. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінен келесідей қорытынды жасауға болады: жоғары целлюлозалитикалық белсенділігі бар мутантты штамм алу үшін кешенді әрсатылы химиялық мутагенез жүргізу, УФ сәулелендіру мен бөлшекті рентгенді сәулелендіру тиімді болып табылады.

Түйін сөздер: Штамм-продуценттер, химиялық мутагенез, УФ, рентген, сәулелендіру, целлюлозалитикалық белсенділік.

S.G. Kamanova., D.B. Toymbaeva., N.L. Nechay, G.H. Ospankulova

Enhancing of cellulolytic activity of cellulase and β-glucanase producing strains

In this work, we studied the effect of complex influence of chemical and physical mutagens on the cellulase-producing strains and β-glucanases to strengthen cellulolytic activity. The research resulted in the following conclusions: conducting comprehensive phase-effects of chemical mutagenesis, UV radiation and fractional X-ray irradiation is effective to obtain mutant strains with high cellulolytic activity.

Keywords: Producer strains, chemical mutagenesis, UV, X-rays, radiation, cellulolytic activity.

Производство ферментных препаратов является одним из ведущих направлений в развитии микробиологической промышленности. Спрос на них постоянно растет, а сфера применения расширяется. Это связано с тем, что ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения.

Для повышения ферментативной активности штамма-продуцента применяют различные методы мутагенеза, которые позволяют повысить производительность штаммов и снизить затраты на их культивирование.

Использование ультрафиолетового света в качестве мутагена может привести как к мутагенезу, так и к гибели клеток микроорганизмов. В научной литературе широко представлены работы по получению мутантных штаммов-продуцентов различных ферментов с использованием УФ-облучения [1-2].

Мутантные штаммы-продуценты также получают в результате химического мутагенеза под влиянием таких веществ, как нитрозогуанидин, N –нитрозометилмочевина (НММ), этилметансульфонат и др. [3-5].

Материалы и методы

В лаборатории биопереработки зерновых культур ТОО «КазНИИПСХП» в 2013г были проведены исследования по усилению целлюлозолитической активности штаммов.

Для усиления целлюлозолитической активности штаммов грибов рода *Trichoderma* рабочей коллекции была проведена серия опытов по комплексному поэтапному мутагенезу, включающему: обработку химическим мутагеном, УФ и рентгеновское облучение.

Облучение ультрафиолетом микроорга-низмов проведено по методике Hamad A. и соавт. [6]. Химический мутагенез проведен по методу Морикава и соавт. [7]. Рентген облучение проводили на установке АРг-Ц-РП (ПроГраф-7000Т) производства ЗАО «Рентгенпром» (Россия). Целлюлозолитическая активность мутантных штаммов определялась на 7-е сутки культивирования [8]. Для проведения химического мутагенеза из рабочей коллекции было отобрано 4 штамма: *Hypocrea lixii* Z8, *Trichoderma gamsii* S7, *Trichoderma citrinoviride* DS4, *Trichoderma harzianum* SS7.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований, на первом этапе усиления целлюлозолитической активности штаммов, было проведено 2-е ступени химического мутагенеза.

При проведении первой ступени химического мутагенеза с использованием нитрозометилмочевины в концентрации 0,005%, 0,01%, 0,015% было получено 575 мутантных моноспоровых штаммов, целлюлозолитическая активность которых была исследована по отношению к NaKMЦ (Na-карбоксиметилцеллюлоза), МКЦ (Микрокристаллическая целлюлоза), FPA (фильтровальная бумага). Наибольший выход мутантов, обладающих цело-лозолитической активностью, отмечался у штамма DS4-211 шт, Z8-168 шт, менее у SS7-140 шт. Штамм S7 значительно терял жизнеспособность при обработке нитрозометилмочевинной, в связи с этим, число моноспоровых мутантов составило 56 шт.

Высокая целлюлозолитическая активность (зона деструкции достигала 15 мм) отмечалась по отношению к FPA у мутантов штаммов Z8, S7, DS4, SS7 практически по всем концентра-циям нитрозометилмочевины. МКЦ актив-ность проявилась только у мутантов S7, DS4, при концентрации нитрозометил-мочевины 0,005%, 0,015%. NaKMЦ-назная активность была характерна для мутантов Z8, DS4, SS7.

Для проведения второй ступени мутации были отобраны следующие штаммы: Z8/15(0,01); Z8/25(0,015); DS4/2(0,005), DS4/21(0,015), SS7/3(0,005), SS7/12(0,015), SS7/14(0,01), S7/1(0,015), S7/12(0,015). При проведении второй ступени мутагенеза с использованием нитрозометилмочевины в концентрации 0,005%, 0,015% было получено 563 мутантных моноспоровых культур, целлюлозолитическая активность которых была исследована по отношению к NaKMЦ, МКЦ, FPA. Надо отметить, что по отношению к FPA высокую целлюлозолитическую активность проявляли мутанты штаммов Z8/25(0,015), DS4/2(0,005), SS7/12(0,015), SS7/14(0,01), зона деструкции достигала 15 мм, по отношению к NaKMЦ - Z8/25(0,015), DS4/21(0,015) - зона деструкции достигала 12 мм; к МКЦ - Z8/25(0,015), SS7/14(0,01) - зона деструкции достигала 11 мм. При обработке штаммов на второй ступени химического мутагенеза наименьшей целлюлозолитической активностью обладали штаммы, обработанные нитрозометилмочевинной в концентрации 0,015%.

Далее для усиления целлюлозолитической активности штаммов-продуцентов было использовано УФ-облучение. Для исследований отобрали 8 мутантных штаммов с высокой целлюлозолитической активностью. УФ-облучение штаммов проводили в течение 10 минут, с перерывом 5 мин и темновой фазой 12 ч. Максимальный выход мутантов с высокой целлюлозолитической активностью по отношению к FPA был отмечен у штаммов SS7/14(0,01)/1(0,005), DS4/2(0,005)/4(0,005) и составил 14,3%-11,8% (таблица 1), зона деструкции достигала 25 мм.

Таблица 1 – Число штаммов, обладающих целлюлозолитической активностью (две ступени химического мутагенеза + УФ)

№ штамма	Число мутантных штаммов, %								
	Зона деструкции 0-5 мм			Зона деструкции 6-10 мм			Зона деструкции более 10 мм		
	NaKMЦ	МКЦ	FPA	NaKMЦ	МКЦ	FPA	NaKMЦ	МКЦ	FPA
SS7/12(0,015)/4(0,005)	59,1	-	-	-	18,2	27,3	-	4,5	9,1
SS7/14(0,01)/1(0,005)	100	57,1	28,6	-	42,9	64,3	-	-	14,3
SS7/12(0,005)/4(0,005)	100	84,6	38,5	-	7,7	53,3	-	7,7	7,7
DS4/2(0,015)/10(0,005)	100	66,6	55,6	-	22,2	44,4	-	-	-
DS4/21(0,015)/3(0,005)	62,5	56,3	56,3	-	37,5	37,5	-	-	-
DS4/21(0,015)/4(0,005)	-	100	100	100	-	-	-	-	-
DS4/21(0,015)/1(0,005)	100	100	100	-	-	-	-	-	-
DS4/2(0,005)/4(0,005)	100	70,6	64,7	-	17,6	11,8	-	5,9	11,8

Среди мутантных штаммов, активно разрушающих МКЦ, выход достигал 7,7%, 5,9%, 4,5% по исходным штаммам SS7/12(0,015)/4(0,005), DS4/2(0,005)/4(0,005), SS7/12(0,005)/4(0,005) соответственно. У мутантных штаммов отсутствовала высокая NaKMЦ-назная активность. В связи с этим, в результате проведенного УФ-облучения для усиления целлюлозолитической активности штаммов-продуцентов было проведено рентгеновское облучение следующих мутантов: DS4/21(0,015)/3(0,005)/27(УФ); SS7/12(0,015)/4(0,005)/1(УФ). В результате рентгеновского облучения у мутантных штаммов, полученных в результате воздействия двумя ступенями нитрозометилмочевиной и одной ступенью УФ облучения, было отмечено усиление целлюлозолитической активности (зона деструкции NaKMЦ – до 30 мм). Высокой целлюлозолитической активностью обладал мутантный штамм SS7/12(0,015)/4(0,005)/1(УФ), зона деструкции NaKMЦ составляла – 28 мм, FPA-13 мм, МКЦ-10 мм.

В результате проведенных исследований, установлено, что проведение комплексного поэтапного химического мутагенеза с концентрацией нитрозометилмочевины 0,005 и 0,015%, 10 минутного УФ-облучения с перерывом пять минут и темновой фазой 12 ч, а также дробного рентгеновского облучения дозой 3,6 и 3,8 микрозиверта является наиболее эффективным для получения мутантных штаммов с высокой целлюлозолитической активностью.

Литература

- 1 Kotchoni O.S., Shonukan O.O. Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulose in *B. pumilus* // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2002. –V.18. – P. 487-491.
- 2 Herrera-Estrella A., Horwitz B.A. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception // Mol. Microbiol. – 2009. –V. 64. –P. 5–15.
- 3 Tisch D., Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. –V. 85. – P. 1259–1277.
- 4 Shafique S., Bajwa R. Strain improvement in *Trichoderma viridi* through mutation for overexpression of cellulose and characterization of mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD) // African Journal of Biotechnology. – 2011. – V.10 (84). – P.19590-19597.
- 5 Isabelle T. Crawford and Uldis N. Strips Methods for mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* // Journal of Microbiological Methods. – 1990. –V.11. – P. 241- 246.
- 6 Anjum Z.M., Khalil-ur-Rahman, Sheikh M.A., Khan I.A. Chemically Treated Strain Improvement of *Aspergillus niger* for Enhanced Production of Glucose Oxidase // International journal of agriculture & biology. – 2010. – V.12. – No.6. – P. 83-88.
- 7 Hamad A, Haq I, Qadeer MA, Javed I. Screening of *Bacillus licheniformis* mutants for improved production of alpha-amylase // Pak. Jour. Bot. – 2001. –V.33 (special issue). –P. 517-525.
- 8 Savenkova L.V., Marina I. Cherepennikova-Anikina Effect of Metalaxyl and N-nitro-N-nitrosomethylurea on Mating Type of *Phytophthora infestans* // J. Russian Phytopathol. Soc. – 2002. – V.3. –P.33-38.
- 9 Синицин А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы определения активности целлюлаз // Итоги науки и техники // Биотехнология. – 1993. – Т.25. – С.38-64.