



Биолог. журн. Армении, 1 (75), 2023

DOI:10.54503/0366-5119-2023.75.1-22

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ И БИОДЕГРАДИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ ГРИБОВ

Н.С. ХАЧАТУРЯН, С.А. ГЕВОРГЯН, Т.С. ДАВИДЯН,
Н.Л. КАЗАНЧЯН

Центр депонирования микробов НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
nghazan@yandex.ru

Охарактеризованы ферментативные свойства некоторых штаммов грибов из коллекции культур микроорганизмов Центра депонирования микробов (учреждение НПЦ “Армбиотехнология” НАН Армении). Определены липазная, протеазная и полифенолоксидазная активности. Установлено, что липазная активность у исследуемых грибов, в основном, отмечается при наличии в среде твина-40 и твина-60. Показано, что *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrisogenum*, *P. decumbens*, *Phoma eupyrena* и ряд других грибов имеют биообрастающую активность по отношению к полиэтилену, полиэтилентерефталату и некоторым другим синтетическим полимерам.

Грибы – ферменты – органические кислоты – полимеры – биообрастание – биодegradация

Բնութագրվել են Մանրէների ավանդադրման կենտրոնի (ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի հիմնարկ) մանրէների կուլտուրաների հավաքածուից սկզբի որոշ շտամների ֆերմենտատիվ հատկությունները: Որոշվել են լիպազային և պոլիֆենոլօքսիդազային ակտիվությունները: Հաստատվել է, որ հետազոտվող սկզբի լիպազային ակտիվությունը հիմնականում նկատվում է միջավայրում տվին-40 և տվին-60 նյութերի առկայության դեպքում: Ցույց է տրված, որ *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrisogenum*, *P. decumbens*, *Phoma eupyrena* և մի շարք այլ սկզբ ունեն պոլիէթիլենի, պոլիէթիլենտալատի և որոշ այլ սինթետիկ պոլիմերների վրա աճելու ունակություն:

Սկզբեր – ֆերմենտներ – օրգանական թթուներ – պոլիմերներ – կենսաճ – կենսաքայքայում

The enzymatic properties of some strains of fungi from the collection of microbial cultures of the Microbial Depository Centre (“Armbiotechnology” Scientific and Production Centre of the National Academy of Sciences of Armenia) have been characterized. Lipase and polyphenol oxidase activities have been determined. It has been found that the lipase activity of the fungi studied was mainly observed in the presence of tween-40 and tween-60 in the medium. *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrisogenum*, *P. decumbens*, *Phoma eupyrena* and some other fungi are shown to have overgrowth activity against polyethylene, polyethylene terephthalate and some other synthetic polymers.

Fungi – enzymes – organic acids – polymers – overgrowth – biodegradation

Биоразложение органических и синтетических материалов микроорганизмами является основным способом очистки окружающей среды. Разные виды микробов, выделяемые из почвы, наделены ферментной системой, способной минерализовать сложные синтетические соединения. В эту систему входят, например, липазы, протеазы, кутиназы, целлюлозолитические ферменты [7, 11]. Современные исследования направлены на выявление микроорганизмов, наделенных новыми, более активными биоразрушающими системами, таких как бактерии, грибы, и создание сообществ таких микробов [12]. Наряду с этим необходимо отметить, что современных методов и подходов недостаточно для обеспечения биodeградации синтетических полимеров.

Цель работы – исследование штаммов митоспорических грибов, способных биообработать синтетические полимеры с оценкой их биodeградирующего потенциала, а также характеристика некоторых ферментных свойств грибов.

Материалы и методы. В качестве тест-организмов были выбраны штаммы митоспорических грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Ulocladium* из коллекции культур микроорганизмов Центра депонирования микробов (ЦДМ, НПЦ “Армбиотехнология” НАН Армении) и наборы, составленные из этих грибов.

Были изучены некоторые ферментативные свойства этих штаммов. Липазную активность определяли с использованием различных твинов: 20, 40, 60, 80, которые стерилизовали отдельно в виде водных растворов и добавляли к растопленной питательной среде, охлажденной до 40-50°, в конечной концентрации – 1 %. Предварительно выращенные на среде Чапека 14-суточные культуры грибов инокулировали на среды, содержащие твины и инкубировали при 28°. Реакцию фиксировали по образованию зон преципитации вокруг нанесенных культур грибов [2].

Полифенолоксидазную активность у штаммов устанавливали биохимическими тестами по Тейлору [1]. Определение проводили в чашках Петри в среде следующего состава (г/л): пептон – 10,0; NaCl – 5,0; CaCl₂ – 0,1; агар – 10,0; pH – 7,4. Активность фермента определяли по изменению цвета вокруг зоны роста грибов. О наличии п-дифенолоксидазной активности у штамма свидетельствовало коричневое окрашивание вокруг зоны роста гриба после 3-х сут. инкубации на среде с 0,06 % танина. В качестве субстрата для определения о-дифенолоксидазной активности использовали тирозин. Потемнение агара вокруг зоны роста колонии на среде с 0,2% тирозина через 2-3 сут. указывало на присутствие фермента.

Для исследования биodeградирующей активности грибов были выбраны 6 различных видов пластика: полиэтилентерефталат (PET), полиэтилен высокой плотности (PEHD), полиэтилен низкой плотности (LDPE), полипропилен (PP), полистирол (PS), прочие (O или Other). Идентификация пластмасс была выполнена согласно принятым символам полимеров. Пластмассы очищали с использованием воды и мыла и дезинфицировали 70 % этанолом. Затем их сушили при 50° С в течение 24 часов. Каждый пластик был разрезан на кусочки (приблизительно площадью в 5 см²). Зараженные образцы пластика инкубировали 60 дней при 28°С. Степень обрастания оценивали по пятибалльной шкале ГОСТ 9.048-89 [3].

Результаты и обсуждение. Коллекция культур ЦДМ включает широкое разнообразие штаммов грибных деградантов, выделенных из поврежденных полимерных материалов, используемых в космической технике, а также образцов полимеров после натуральных испытаний в различных климатических условиях [5, 8]. Важнейшим этапом в оценке биodeградации полимерных материалов является характеристика ферментативных свойств, синтезируемых органических кислот и других микробных метаболитов [6]. Органическими кислотами грибного происхождения, способствующими микробной деструкции полимерных материалов, в основном являются винная, лимонная, фумаровая, яблочная, янтарная, молочная,

которые могут быть показателями при отборе грибных деградантов. В этом отношении важным фактором является коэффициент кислотообразования, позволяющий рассчитать количество каждой кислоты в литре культуральной жидкости (кж) и относительную долю индивидуальных кислот по отношению к винной, как наиболее сильной [4]. Характеристика биосинтеза органических кислот грибных штаммов, вошедших в наборы по оценке биостойкости полимерных материалов, представлена в табл. 1.

Таблица 1. Органические кислоты, синтезируемые культурами грибов-деградантов (Среда Чапека, рН 6,5, инкубация 7 дней, 28⁰С)

Виды грибов	рН после роста	Коэффициент кислотообразования, г/л кж				
		Винная	Лимонная	Яблочная	Янтарная	Фумаровая
<i>Aspergillus fumigatus</i> 8276, 12036 <i>A.versicolor</i> 12089 <i>Penicillium aurantiogriseum</i> 12076, 12078, 12079 <i>P.chrysogenium</i> 8304, 8366, 12039, 12110 <i>P. melinii</i> 12060, 12083	3,5 - 4,0	0,05 - 0,2	0,05-0,2	0,03-0,1	0,02-0,1	0,03- 0,1
<i>P.aurantiogriseum</i> 12057, 12090 <i>P.melinii</i> 12035, 12087, 12066 <i>Ulocladium botrytis</i> 12037	5,0 -5,8	0,01- 0,05	0,01-0,05	0,01-0,03	0,01-0,02	0,01-0,02

Способность грибов продуцировать в среду большое количество органических кислот достаточно давно известна. В настоящее время последовательность реакций, лежащих в основе метаболизма большинства кислот, образуемых грибами, хорошо изучена [9, 10]. Анализ способности грибов продуцировать органические кислоты в условиях культуры показал, что многие микромицеты, в первую очередь представители родов *Penicillium* и *Aspergillus*, выделяют органические кислоты в процессе роста. Самыми распространёнными кислотами, продуцируемыми грибами, являются лимонная, янтарная, яблочная, фумаровая, щавелевая и глюконовая кислоты. В наибольших количествах, как правило, образуются глюконовая и щавелевая кислоты.

Полученные нами данные показали, что подавляющее большинство изученных штаммов грибов-деградантов характеризуется активным кислотообразованием. Среди культур грибов по коэффициенту кислотообразования выделяются штаммы с показателем 0,1 - 0,3 г/л, которые агрессивно действуют на полимерные материалы.

В процессах биодegradации определенную роль играют и другие метаболиты грибов, такие как ферменты, особенно оксидоредуктазы (полифенолоксидазы, пероксидаза, каталаза) и эстеразы (липазы, фосфатазы), повреждающие полимеры, синтезированные на основе полифенолов и полиэфиров. Была изучена

протеолитическая и полифенолоксидазная активность штаммов грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium* и *Trichoderma*. В качестве субстратов использовали следующие вещества: танин, L-тирозин. Выборочные данные по протеазной и полифенолоксидазной активности представлены в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика ферментативной активности культур грибов-деградантов

Виды грибов	Пероксидаза	Каталаза	Полифенолоксидаза	
			субстрат	
			танин	L-тирозин
<i>Aspergillus niger</i> 8133	3+	3+	+	2+
<i>A. niger</i> 8266	3+	3+	3+	+
<i>A. terreus</i> 10635	3+	3+	2+	-
<i>A. terreus</i> 10640	3+	3+	2+	2+
<i>A. versicolor</i> 12089	3+	3+	2+	2+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 12062, 12064	3+	3+	2+	2+
<i>P. aurantiogriseum</i> 12057, 12078, 12079, 12090	3+	3+	+	+
<i>P. commune</i> 8301	3+	3+	3+	-
<i>P. chrysogenum</i> 8304	3+	3+	3+	+
<i>P. chrysogenum</i> 8366	3+	3+	2+	-
<i>P. expansum</i> 8189	3+	3+	3+	-
<i>P. melinii</i> 12060, 12083	3+	3+	+	+
<i>P. melinii</i> 12066, 12087	2+	3+	-	-
<i>Trichoderma viride</i> 8125	3+	3+	+	-
<i>T. viride</i> 10694	3+	3+	+	+

Примечание: Степень активности ферментов отмечена по 3-балльной шкале.

Согласно полученным данным все изученные штаммы образуют каталазу и пероксидазу. Полифенолоксидазы продуцируют культуры *P. aurantiogriseum* 12057, 12062, 12064, 12078, 12079, 12090; *P. melinii* 12060, 12083; *A. versicolor* 12089. При этом можно отметить, что протеолитическая активность грибов в основном наблюдалась при наличии в среде танина. Наиболее активными из исследованных грибов оказались *Aspergillus niger* 8266, *A. terreus* 10640 и *Penicillium chrysogenum* 8304.

Изучена липазная активность некоторых штаммов рода *Aspergillus*, *Penicillium* и *Ulocladium*. В качестве субстрата использовали вещества: твин-20, твин-40, твин-60, твин-80. Результаты представлены в табл. 3.

Надо отметить, что липолитическая активность лучше выражена у грибов рода *Penicillium*. Исследования показали, что изученные культуры грибов гидролизуют твин-20 (полиоксиэтиленсорбитан монолаурат) и твин-80 (полиоксиэтиленсорбитан моноолеат). Некоторая варибельность наблюдается у определенных видов. Твин-40 (полиоксиэтиленсорбитан монопальмитат) гидролизуются культурами *P. aurantiogriseum* 12057, 12062, 12064, 12077, 12078; *P. melinii* 12060, 12083; *P. chrysogenum* 12039, 12110; *A. versicolor* 12089. Твин-60 (полиоксиэтиленсорбитан тристеарат) гидролизуют *P. aurantiogriseum* 12051, 12061, 12062, 12064, 12075, 12040, 12076, 12050; *P. melinii* 12083, 12087; *A. versicolor* 12089.

Твин-60 (полиоксиэтиленсорбитан тристеарат) гидролизуют *P. aurantiogriseum* 12051, 12061, 12062, 12064, 12075, 12040, 12076, 12050; *P. melinii* 12083, 12087; *A. versicolor* 12089. Липазная активность у грибов рода *Aspergillus* отмечена в ос-

новном при наличии в среде твина-40 и твина-60. Реже встречаются штаммы рода *Aspergillus* с липолитической активностью относительно твинов-20 и -80.

Таблица 3. Характеристика липазной активности культур грибов-деградантов

Виды грибов	Субстрат			
	твин-20	твин-40	твин-60	твин-80
<i>Aspergillus versicolor</i> 12089	3+	+	2+	3+
<i>A.terreus</i> 8154	-	+	2+	-
<i>A.terreus</i> 8348	-	2+	-	-
<i>A.terreus</i> 8500, 8462, 10559	-	-	-	-
<i>A.flavus</i> 8198	-	2+	2+	-
<i>A.flavus</i> 10561	-	-	-	2+
<i>A.flavus</i> 10565	-	2+	2+	2+
<i>A.flavus</i> 10714	-	2+	-	-
<i>A.fumigatus</i> 8276	+	+	+	+
<i>A.tamarii</i> 8171	2+	+	2+	-
<i>A.tamarii</i> 8333	-	2+	2+	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 12051, 12061, 12075, 12040, 12076, 12050	3+	-	2+	3+
<i>P. aurantiogriseum</i> 120062, 12064	3+	2+	2+	3+
<i>P. aurantiogriseum</i> 12077, 12078, 12057	3+	+	-	3+
<i>P. aurantiogriseum</i> 12090, 12079	3+	-	-	2+
<i>P. melinii</i> 12060	3+	2+	-	3+
<i>P. melinii</i> 12083	3+	3+	+	3+
<i>P. melinii</i> 12087, 12066	+	-	3+	3+
<i>P. chrysogenum</i> 12039, 12110	+	2+	-	2+
<i>Ulocaldium botrytis</i> 12037	2+	-	-	3+

Примечание: Степень активности ферментов отмечена по 3-балльной шкале.

На основе биосинтеза органических кислот и ферментативных активностей были отобраны пять штаммов митоспорических грибов с высоким потенциалом биodeградирующей активности: *Penicillium stekii* 8220, *P. chrysogenum* 12110, 12039, *P. melinii* 12035, *Aspergillus fumigatus* 12101, *Phoma eupyrena* 12047, а также наборы из этих грибов. Проведены исследования по изучению их биodeградирующей активности на основе обрастания образцов различных пластикутов. В табл. 4 обобщены полученные данные по биообрастанию различных синтетических полимеров.

У *Aspergillus fumigatus* 12101 и *Penicillium chrysogenum* 12110 наряду с набором грибов выявилась сравнительно высокая степень обрастания, а самая низкая наблюдалась у *Penicillium melinii* 12035.

Обобщенные данные по ферментативной активности и оценке микробного обрастания являются весомыми показателями для разработки интегрированных подходов характеристики биodeградации синтетических полимеров с дальнейшим прогнозированием их биodeградации.

Таблица 4. Биообрастание различных видов пластика грибами

Тест - микроорганизмы	Тип полимерных материалов, баллы					
	PEТ	PEHD	LDPE	PP	PS	Other
<i>Aspergillus fumigatus</i> 12101	5	4	3	4	3	4
<i>Penicillium chrysogenum</i> 12110	4	4-5	3	4	3-4	4
<i>Penicillium melinii</i> 12035	2	1	1	1	1	3
<i>Penicillium steckii</i> 8220	1	1	2-3	2-3	2	3
<i>Phoma eupyrena</i> 12047	3	3	1	1	1	2-3
Набор грибов	3-4	3	4	3	3	4

Таким образом, изучение механизмов процессов биоразрушения и биоповреждающего потенциала грибов в разрушении полимерных материалов может способствовать расширению наших представлений в вопросах утилизации отходов полимерного производства и в то же время решению методических подходов для эффективной оценки биостабильности полимерных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аникеев В.В., Лукомская К.А.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии, М., Просвещение, 127 с., 1983.
2. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Под ред. Д.Г. Звягинцева. М., Изд-во МГУ, 224 с., 1980.
3. ГОСТ 9.048-89. Единая система защиты от коррозии и старения. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М., 1989.
4. *Лилли В., Барнет Г.* Физиология грибов. ИЛ, М., 346-353, 1953.
5. *Chitchyan K.V., Kinostyan M.H., Ghazanchyan N.L., Khachaturyan N.S., Gevorgyan S.A., Hakobyan A.G., Davidyanyan T.S.* National Cultures Collection of Microorganisms of Armenia and Storage Methods. Materials of Intern. Scientific-practical. Conf. "Microbial Biodiversity: current problems and solutions", Astana, November 25, p.20-25, 2016.
6. *Gevorgyan S.A., Khachaturyan N.S., Markosyan L.S., Afrikian E.G.* Screening fungal degradants for evaluation of biostability of synthetic polymeric materials. *Biolog. Journ. of Armenia, Special Issue*, 19-23, 2016.
7. *Krueger M.C., Harms H., Schlosser D.* Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Nov*; 21, 99, 8857-8874, 2015.
8. *Kurakov A., Ghazanchyan N., Goginyan V., Gevorgyan S., Harutyunyan A.* Fungal Degradants of Polymeric Materials: Databases and Culture Collection with Atlas. Editor-in chief E. Afrikian. Yerevan, "Edit Print", 250 pp., 2005.
9. *Magnuson J.K.* Organic acid production by filamentous fungi. *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*, 307-340, 2004.
10. *Papagianni M.* Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25, 244-263, 2007.
11. *Sivan A.* New perspectives in plastic biodegradation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22, 422-426, 2011.
12. *Wei R., Zimmermann W.* Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microb. Biotechnol.*, 10, 1308-1322, 2017.

Поступила 07.12.2022