

УДК 582.188.42.577:154

**СКРИНИНГ ГРИБОВ,  
ОБЛАДАЮЩИХ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ****Р.М.ЭЛ-ШАРКАВИЙ, Г.И.ЭЙВАЗОВА, Х.Г.ГАНБАРОВ***Бакинский Государственный Университет**khganbarov@bsu.az*

*Из различных субстратов было выделено 22 штамма грибов, которые в разной степени обладали амилолитической активностью. Высокую активность показали штаммы родов *Aspergillus*, *Alternaria* и *Penicillium*, а наименьшую активность – штаммы родов *Cephalosporium* и *Fusarium*. Наибольшая амилолитическая активность наблюдалась у штаммов *Aspergillus sp.* К8 и М 2-1. Амилолитическая активность данных штаммов была в 1,8-2,2 раза больше, чем у штаммов родов *Cephalosporium* и *Fusarium*.*

**Ключевые слова:** плесневые грибы, скрининг грибов, амилолитическая активность, йодный тест

Амилазы являются широкоприменяемыми ферментами в промышленности. Эти ферменты гидролизуют молекулы крахмала и образуют мономерные единицы глюкозы и декстрина. Амилазные ферменты можно получить из различных источников, а именно из растений, животных и микроорганизмов. В промышленности используются именно микробные амилазы. Высоким уровнем амилазной активности обладают плесневые грибы. В настоящее время продуцентом  $\alpha$ -амилазы для промышленности является *Aspergillus niger* (10, 12, 14).

$\alpha$ -амилаза расщепляет эндодействием  $\alpha$ -(1,4)-гликозидные связи, образуя олигосахариды разной длины и конформации, и декстрины, которые дальше гидролизуются до глюкозы экзодействующими амилазами. Продуцирование амилазных ферментов у микроорганизмов изучено в зависимости от различных физико-химических факторов среды (8, 9, 11).

Применяемые  $\alpha$ -амилазы должны обладать уникальными свойствами, а именно специфичностью и стабильностью к температуре и кислотности. Поэтому поиск новых продуцентов  $\alpha$ -амилаз, прежде всего, должно отвечать новым требованиям промышленности (13). В данном аспекте продолжается поиск новых продуцентов  $\alpha$ -амилаз.

Целью данной работы является поиск новых продуцентов  $\alpha$ -амилаз среди плесневых грибов.

### **Материалы и методы**

Для выделения и получения чистых культур грибов использовали модифицированную среду Чапек-Докса (г/л):  $\text{NaNO}_3$ -3;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.5;  $\text{KCl}$ -0.5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.01; агар-15; сахароза-20, рН6 (7).

Для изучения способности грибов продуцировать крахмалорасщепляющие ферменты, их выращивали в жидкой среде Чапек-Докса. Грибные штаммы выделяли из различных гнилых фруктов (мандарин, фейхоа, хурма, айва, яблоко, лимон, гранат, груша) и овощей (картофель, помидор), привезенных из различных территории Азербайджана. Для этого отрезали небольшую часть ткани фруктов (или овощей) и асептически помещали на поверхность агаризованной среды и инкубировали при 25-30 °С в термостате в течение 5-7 суток. Из выросших колонии грибов пересевом на косяк получали чистые культуры и держали в холодильнике при 4 °С (4, 5).

Отбор крахмалорасщепляющих грибов осуществляли на агаризованной вышеупомянутой среде, содержащей растворимый крахмал в качестве единственного источника углерода. Грибы выращивали на среде в течение 7 суток при 25 °С, после чего среду обрабатывали раствором йода. В зонах, где расщеплялся крахмал под действием грибных амилаз образовывалась прозрачная полоса (зона), что свидетельствовало о способности грибов расщеплять крахмал. Амилолитическую активность грибов, оценивали визуально по пятибалльной шкале и по размеру (см) прозрачной зоны (6, 15).

Грибные штаммы идентифицировали по морфологическим признакам известными методами (2, 3).

Полученные чистые культуры грибов поддерживали на среде Чапек-Докс при 4-6 °С и каждый месяц проводили пересев культур на свежую среду.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали (1).

### **Результаты и обсуждение**

Из гнилых фруктов и овощей, взятых из 9 районов Азербайджана было выделено 22 штамма. Четыре штамма (М 1, М 2-1, М 2-2 и М 6) выделены из мандарина, 2 штамма (F 3-1, F 3-2) из фейхоа, 1 штамм (L13) из лимона, 2 штамма (X 4 и X 16) из хурмы, 3 штамма (Q 5-1, Q 5-2 и Q 7) из айвы, 4 штамма (A 10-1, A 10-2, A 10-3, A 11) из яблока, 1 штамм (AR 15) из сливы, 1 штамм (N 14) из граната, 1 штамм (K8) из картофеля, 3 штамма (T 17-1, T 17-2, Fj 18) из помидора (Табл.1).

Таблица 1

**Штаммы грибов, выделенных из различных субстратов  
на территории Азербайджана**

| Районы     | Субстраты | Штаммы грибов      | Роды грибов           |
|------------|-----------|--------------------|-----------------------|
| Абшерон    | помидор   | T 17-1             | <i>Aspergillus</i>    |
|            |           | T 17-2             | <i>Alternaria</i>     |
|            |           | Fj 18              | <i>Penicillium</i>    |
| Агсу       | айва      | Q 7                | <i>Fusarium</i>       |
| Астара     | мандарин  | M 1                | <i>Cladosporium</i>   |
|            |           | M 2-1              | <i>Aspergillus</i>    |
|            |           | M 2-2              | <i>Cephalosporium</i> |
|            |           | M 6                | <i>Alternaria</i>     |
|            | фейхоа    | F 3-1              | <i>Alternaria</i>     |
|            |           | F 3-2              | <i>Aspergillus</i>    |
| лимон      | L13       | <i>Aspergillus</i> |                       |
| Гейчай     | гранат    | N 14               | <i>Penicillium</i>    |
| Губа       | яблоко    | A 11               | <i>Aspergillus</i>    |
|            | груша     | AR 15              | <i>Alternaria</i>     |
| Джалилабад | картофель | K 8                | <i>Aspergillus</i>    |
| Закатала   | хурма     | X 4                | <i>Fusarium</i>       |
|            |           | X 16               | <i>Alternaria</i>     |
| Ленкорань  | айва      | Q 5-1              | <i>Fusarium</i>       |
|            |           | Q 5-2              | <i>Penicillium</i>    |
| Хачмаз     | яблоко    | A 10-1             | <i>Penicillium</i>    |
|            |           | A 10-2             | <i>Penicillium</i>    |
|            |           | A 10-3             | <i>Aspergillus</i>    |

При идентификации штаммы F 3-1, M 6, X 16 и T 17-2 были отнесены к роду *Alternaria*, штаммы M 2-1, F 3-2, L13, K8, A 10-3, A 11, AR 15 и T 17-1 к роду *Aspergillus*, штамм M 2-2 к роду *Cephalosporium*, штамм M 1 к роду *Cladosporium*, штаммы X 4, Q 5-1, Q 7 к роду *Fusarium*, штаммы Q 5-2, A 10-1, A 10-2, Fj 18 и N 14 к роду *Penicillium*. Следовательно, 36% штаммов были отнесены к роду *Aspergillus*, 23% *Penicillium*, 18% *Alternaria*, 14% *Fusarium*, 9% *Cephalosporium* и *Cladosporium* (Табл.1).

Изучение амилолитических свойств грибов показало, что у штаммов рода *Alternaria* амилолитическая активность (диаметр прозрачной зоны) варьировала в пределах 2,1-3,6 см и наибольшая активность наблюдалась у штаммов X 16, F 3-1 и T 17-2, а у штаммов рода *Aspergillus* амилолитическая активность варьировала в пределах 3,2-4,6 см и наибольшая активность наблюдалась у штаммов K8, M 2-1 (диаметр прозрачной зоны составлял 4,3-4,6 см). У штаммов рода *Fusarium* амилолитическая активность варьировала в пределах 2,1-2,4 см, а у штаммов рода *Penicillium* 3,0-4,0 см. Наибольшая амилолитическая активность у последних наблюдалась у штаммов A 10-1 и Fj 18 (Табл. 2).

Таблица 2

**Амилолитическая активность грибных штаммов, выделенных из различных субстратов на территории Азербайджана**

| Роды грибов           | Штаммы грибов | Зона разложения крахмала (см) | Йодный тест (визуально по 5 бальной шкале ) |
|-----------------------|---------------|-------------------------------|---|
| <i>Alternaria</i>     | F 3-1         | 3,5                           | ++++  |
|                       | M 6           | 2,9                           | +++   |
|                       | X 16          | 3,6                           | ++++  |
|                       | T 17-2        | 3,5                           | +++   |
| <i>Aspergillus</i>    | A 10-3        | 3,5                           | +++   |
|                       | A 11          | 3,7                           | ++++  |
|                       | AR 15         | 3,2                           | +++   |
|                       | L13           | 3,8                           | ++++  |
|                       | F 3-2         | 3,5                           | ++++  |
|                       | K 8           | 4,6                           | +++++                                       |
|                       | M 2-1         | 4,3                           | ++++  |
|                       | T 17-1        | 3,9                           | ++++  |
| <i>Cephalosporium</i> | M 2-2         | 2,1                           | ++  |
| <i>Cladosporium</i>   | M 1           | 2,9                           | +++   |
| <i>Fusarium</i>       | Q 5-1         | 2,4                           | ++  |
|                       | Q 7           | 2,1                           | ++  |
|                       | X 4           | 2,3                           | ++  |
| <i>Penicillium</i>    | A 10-1        | 4,0                           | ++++  |
|                       | A 10-2        | 3,1                           | +++   |
|                       | Q 5-2         | 3,0                           | +++   |
|                       | N 14          | 3,3                           | ++++  |
|                       | Fj 18         | 3,8                           | ++++  |

Высокая амилолитическая активность наблюдалась среди штаммов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Alternaria*, а наименьшую активность показали штаммы родов *Fusarium* и *Cephalosporium*. Так, у штаммов K8 и M 2-1 рода *Aspergillus* амилолитическая активность была в 1,8-2,2 раза больше чем у штаммов рода *Fusarium* и *Cephalosporium* (Табл. 2).

Таким образом, из различных гниющих субстратов (фрукты и овощи) было выделено 22 штамма, из которых 4 штамма относились к роду *Alternaria*, 8 штаммов к роду *Aspergillus*, 5 штаммов к роду *Penicillium*, 3 штамма к роду *Fusarium*, 1 штамм к роду *Cephalosporium* и 1 штамм к роду *Cladosporium*.

Все штаммы грибов в разной степени обладали амилолитической активностью. Высокую активность показали штаммы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Alternaria*, а наименьшую активность штаммы родов *Fusarium* и *Cephalosporium*. Также, наибольшая амилолитическая активность наблюдалась у штаммов *Aspergillus* sp. K8 и M 2-1. Амилолитическая активность данных штаммов была в 1,8-2,2 раза больше чем у штаммов родов *Fusarium* и *Cephalosporium*.

## LİTERATURA

1. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990, 300 с.
2. Литвинов М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Л.: Наука, 1967 с.
3. Райлло А. И. Грибы рода *Fusarium*. М., 1950, 415 с.
4. Amusa N.A., Kehinde I.A., Ashaye O. A. Bio-deterioration of Breadfruit (*Artocarpus communis*) in storage and its effects on the Nutrient Composition // African Journal of Biotechnology, 2002, v. 1(2), p. 57-60.
5. Baiyewu R.A., Amusa N.A., Ayoola O.A., Babalola O.O. Survey of the post harvest Diseases and Aflatoxin Contamination of Marketed Pawpaw Fruit (*carica papaya*) in South Western Nigeria // African Journal of Agricultural Research, 2007, v. 2(4), p. 178-181
6. Bergmann F.W., Abe J., Hizukuri S. Selection of microorganisms which produce raw-starch degrading amylase // Appl. Microbial. Biotechnol., 1988, v. 27, p. 443-446.
7. Coral G., Arikani B., Unaldi M., Güvenmez H. Some properties of thermostable xylanase from an *Aspergillus niger* strain // Ann. Microbial., 2002, v. 52, p 299-306.
8. Fogarty W.M., Kelly C.T. Starch degrading enzymes of microbial origin // Prog. Ind. Microbiol., 1979, v. 15, p. 87-150.
9. Lonsane B.K., Ramesh M.V. Production of bacterial thermostable  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis // Advances in applied microbiology, 1990, v. 35, p. 1-56.
10. Pandey A., Nigam P., Soccol C., Soccol V., Singh D., Mohan R. Advances in microbial amylases // Biotechnol Appl Biochem., 2000, v. 31, p. 135-152.
11. Priest F.G. Exteracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev., 1977, v. 41, p. 711-53.
12. Rodrigues V., Alameda E., Gallegos J., Requena A., López A. Enzymatic Hydrolysis of Soluble Starch with an  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* // Biotechnol. Prog., 2006, v. 22, p. 718-722.
13. Wanderley K.J., Torres F.A.G., Moraes L.M.P., Ulhoa C.J. Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus* // FEMS Microbiol Lett., 2004, v. 231, p. 165-169.
14. Windish W., Mhatre N. Microbial amylase / Advances in applied microbiology, Wayne WU, editor. New York: Academic Press, 1965, v.7, p. 273-304.
15. Yuguo Z., Zhao W., Xiaolong C.  $\alpha$ -Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an externalloopairlift bioreactor// Biochem Engineer J., 2000, v.5, p. 115-121.

## AMİLOLİTİK AKTİVLİYƏ MALİK GÖBƏLƏKLƏRİN SKRİNİNİ

R.M.EL-ŞARKAVİ, Q.İ.EYVAZOVA, X.Q.QƏNBƏROV

### XÜLASƏ

Müxtəlif substratlardan müxtəlif dərəcədə amilolitik aktivliyə malik 22 göbələk ştamı ayrılmışdır. *Aspergillus*, *Alternaria* və *Penicillium* cinsli göbələk ştamları yüksək aktivliyə, *Cephalosporium* və *Fusarium* cinsli göbələk ştamları isə zəif aktivliyə malik olmuşlar. Göbələk ştamları içərisində çox yüksək aktivlik *Aspergillus* sp. K8 və M 2-1 kulturalarında müşahidə olunub. Bu ştamların amilolitik aktivliyi 1,8-2,2 dəfə *Cephalosporium* və *Fusarium* cinsli göbələk ştamlarından çox olmuşdur.

**Açar sözlər:** kif göbələkləri, göbələklərin skrininqi, amilolitik aktivlik, yod testi

## SCREENING OF FUNGI EXHIBITING AMYLOLYTIC ACTIVITY

R.M.EL-SHARKAWY, G.I.EYVAZOVA, Kh.G.GANBAROV

### SUMMARY

Twenty two amylolytic fungal strains were isolated from various substrates. High amylolytic activity was registered in by strains of genera *Aspergillus*, *Alternaria* and *Penicillium*, whereas *Cephalosporium* and *Fusarium* showed the lowest-activity. Strains of *Aspergillus* sp. K8 and M 2-1 were recorded as high amylolytic strains. Amylolytic activity of these strains was 1,8-2,2 times higher than that given by *Cephalosporium* and *Fusarium* strains.

**Key words:** molds, fungal screening, amylolytic activity, iodine test.

*Поступило в редакцию: 17.09.2012 г.*

*Подписано к печати: 23.10.2012 г.*