



ფიზიკა-მათემატიკურ და კომპიუტერულ მეცნიერებათა
სკოლა (ფაკულტეტი)
მცენარეთა ბიოლოგია და ბიოტექნოლოგია

ილონა ძალამიძე

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი სადისერტაციო ნაშრომი

თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოების სტაბილური
ცელულაზა და ქსილანაზა

დოქტორანტის სამეცნიერო ხელმძღვანელი

გიორგი კვესიტაძე

ბიოლოგიის მეცნიერებათა

დოქტორი, საქართველოს

ეროვნული მეცნიერებათა

აკადემიის ბიოლოგიური

მეცნიერების განყოფილების

აკადემიკოსი-მდივანი

თბილისი

2012

სარჩევი

ანოტაცია	5
შესავალი	9
თავი I	14
ლიტერატურის მიმოხილვა	14
1.1 მიკროორგანიზმების ქსილანაზები და ცელულაზები	14
1.2 ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები	26
თავი II	40
კვლევის მასალები და მეთოდები:	40
2.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა	40
2.2 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაცია	42
2.3 ცელულაზების და ქსილანაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით)	43
2.4 საერთო ცელულაზური აქტივობის განსაზღვრა ფილტრის ქაღალდის მიხედვით	44
2.5 ენდო-1,4-β-D-ქსილანაზური აქტივობის განსაზღვრა	45
2.6 კმც-აზური აქტივობის განსაზღვრა	46
2.7 β-გლუკოზიდასას აქტივობა	46
2.8 კულტურების პათოგენურობის დადგენა	47
2.9 ტოქსიკურობის განსაზღვრა კურდღელზე კანის სინჯის მიხედვით	48
2.10 ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა	48
2.11 ცელულაზების და ქსილანაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება	49
2.12 ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმების დადგენა	49
2.13 SDS გელ – ელექტროფორეზი	50
2.14. იზოელექტროფოკუსირება	50

2.15 ცელულოზა შემცველი სუბსტრატების ფერმენტული ჰიდროლიზი	51
2.16 აღმდგენელი შაქრების განსაზღვრა	51
2.17 გლუკოზის განსაზღვრა	52
2.18 ექსპერიმენტული მონაცემების დამუშავების ელემენტარული მათემატიკური ფორმულა	52
თავი III	53
მიღებული შედეგები და მათი განხილვა:	53
ცელულაზა-ქსილანაზას პროდუცენტი თერმოფილური სოკოების შტამების სელექცია და მათი ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური დახასიათება	53
3.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა	53
3.2 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება	55
3.3 ცელულაზების და ქსილანაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით)	58
3.4 გამოყოფილი კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა	62
3.5 ცელულაზების და ქსილანაზების აქტიური პროდუცენტი ექსტრემოფილური, მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ფიტო და ზოოპათოგენურობის დადგენა	69
3.6 ცელულაზებისა და ქსილანაზების აქტიური პროდუცენტებისათვის საკვები არეების ოპტიმიზაცია	70
3.7 ცელულაზების პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას	73
3.8 ქსილანაზის პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას	76
თავი IV	86

ცელულაზებისა და ქსილანაზების ფერმენტული პრეპარატების დახასიათება, ფერმენტული პრეპარატების მოქმედებების ოპტიმუმების დადგენა	86
4.1 ტექნიკური პრეპარატების მიღება	86
4.2 ცელულაზების მოქმედებების ტემპერატურული ოპტიმუმების დადგენა	88
4.3 ცელულაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედებების pH ოპტიმუმების დადგენა	89
4.4 ქსილანაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედებების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმების დადგენა	91
4.5. <i>Penicillium canescence</i> Sj 4-1 -ის ტექნიკური პრეპარატის ნაწილობრივი გაწმენდა	94
4.6 <i>Penicillium canescence</i> Sj 4-1 - ის ნაწილობრივ გაწმენდილი ფერმენტული პრეპარატის ზოგიერთი ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლების დადგენა	97
4.6.1 pH-ის გავლენა ენდო-1,4 β-D ქსილანაზას აქტივობასა და სტაბილურობაზე	97
4.6.2 ტემპერატურის გავლენა ფერმენტ 1,4-β-D ენდოქსილანაზას აქტივობასა და სტაბილურობაზე	98
თავი V	100
თერმოფილური ცელულაზა/ქსილანაზას პრეპარატებით ლიგნოცელულაზური სუბსტრატების ჰიდროლიზი	100
5.1 მცენარეული ნარჩენების ჰიდროლიზი სელექციურად შერჩეული მიკროსკოპული სოკოების ცელულაზებით	100
შედეგების განხილვა	104
დასკვნები	108
გამოყენებული ლიტერატურა	110

ანოტაცია

სხვადასხვა ბუნებრივი და სამრეწველო მიკრობიოლოგიურ ან ფერმენტულ გარდაქმნებზე აგებული ხარისხობრივად ახალი ბიოტექნოლოგიების შექმნისათვის აუცილებელი ხდება განსაკუთრებულ - ექსტრემალურ პირობებში (მაღალი ან დაბალი ტემპერატურა, მჟავა და ტუტე გარემო, მარილების მაღალი კონცენტრაცია, და სხვა) მზარდი მიკროორგანიზმების სელექცია და მათ მიერ წარმოებული სტაბილური ფერმენტების გამოყენება.

დღეისათვის მცირეა იმ ფერმენტების რიცხვი, რომლებიც ფართო მასშტაბით მიიღებიან სამრეწველო მიზნებისათვის. ეს პრობლემა დაკავშირებულია მაღალაქტიური და სტაბილური ფერმენტების გამოვლენასა და მიღებასთან. ბოლო ათი წელია მიკროორგანიზმების სელექციამ თვალნათლივ აჩვენა, რომ ფერმენტების სტაბილური ფორმების ძიება მიზანშეწონილია ძირითადად იმ მიკროორგანიზმებს (ექსტრემოფილები) შორის, რომლებიც ბინადრობენ შედარებით კრიტიკულ პირობებში.

სამუშაოს მიზანს წარმოადგენდა კავკასიის სხვადასხვა ექსტრემალური ეკოლოგიური ნიშიდან მიკროსკოპული სოკოების კულტურების გამოყოფა, ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტი შტამების უპირატესი სელექციით.

გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა, ცელულაზა/ქსილანაზას აქტიური პროდუცენტი - ექსტრემოფილური შტამებისათვის-აქტივობის სრული პოტენციალის გამოსავლენად კულტივირების პირობების შერჩევა, ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებიდან ცელულაზა/ქსილანაზას ფერმენტული პრეპარატების მიღება, შედეგად ამ ფერმენტების სამრეწველო თვისებების დახასიათება და სამრეწველო გამოყენების პერსპექტივების და სხვა.

საქართველოს სხვადასხვა ნიადაგობრივ-ზონიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების 212 კულტურიდან შეირჩეულია ცელულაზა/ქსილანაზას 39 და მარტო ქსილანაზას 9 პროდუცენტი. გამოვლენილია ცელულაზას აქტიური პროდუცენტები მიკროსკოპული სოკოების თერმოფილურ კულტურებს შორის. ოპტიმალური პირობების დადგენით, საკვები არეების შემადგენელი კომპონენტების ოპტიმიზაციით

შტამების მიერ წარმოქმნილი ფერმენტების აქტივობები გაზრდილია თითქმის 200%-მდე. დამუშავებულია შერჩეული შტამების ფილტრატებიდან ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატების მიღების ბიოტექნოლოგია. დადგენილია ცელულაზას და ქსილანაზას მოქმედების pH და ტემპერატურული ოპტიმუმები და სტაბილურობა; ნაჩვენებია რომ თერმოფილი შტამების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმები მიიღწევა 10°C უფრო მაღალ ტემპერატურაზე (60-620°C პირობებში), მეზოფილურ ანალოგებთან შედარებით. მიღებული ცელულაზების საშუალებით შესაძლებელია განახლებადი ნედლეულისაგან და ლიგნინო-ცელულაზური მასალისაგან მიკრობული ცილის, მადუღარი მონოსაქარიდის, თხევადი საწვავის და აგრეთვე ცილით მდიდარი ბიომასის მიღება. შტამი რომელიც ქსილანაზური აქტივობის ფონზე ხასიათდება ცელულაზას ნულოვანი აქტივობით, შეიძლება გამოყენებული იქნეს მაღალი ხარისხის ქაღალდის წარმოებაში.

Abstract

In order to create qualitatively new biotechnologies based on different natural and industrial microbiological or enzymatic transformations, selection of microorganisms growing under extreme conditions (high or low temperature, acid and alkaline conditions, high concentration of salts, etc.) and application of stable enzymes produced by them are prospective.

At present, the number of enzymes, which are obtained in a large scale for industrial purposes, is small. The problem is connected with revealing and obtaining of highly active and stable enzymes. For the last decade, selection of microorganisms has obviously shown that searching of stable forms of enzymes was expedient mainly among the microorganisms (extremophiles) dwelling under comparatively critical conditions.

The goal of the work was isolation of microscopic fungi cultures from different ecological niches of the Caucasus by preferable selection of strains, producers of cellulase/xylanase; determination of the level of extremophilicity in isolated microscopic fungi cultures; selection of cultivation conditions for extremophilic strains to reveal complete activity potential; obtaining of cellulase/xylanase enzymatic preparations from extremophilic microscopic fungi cultures and consequently, characterization of industrial properties and prospects of industrial application of these enzymes, etc.

39 producers of cellulase/xylanase and 9 producers of single xylanase have been selected among 212 microscopic fungi cultures isolated from different soil-climatic zones of Georgia. Active producers of cellulase were revealed among thermophilic cultures of microscopic fungi. By determining of optimal conditions and optimization of nutrient medium components, activities of produced enzymes were increased almost by 200%. Biotechnology of obtaining technical preparations of enzymes from filtrates of selected strains was elaborated; pH of activities, temperature optimums and stabilities of cellulase and xylanase were established. It was shown that temperature optimums of enzymatic preparations for thermophilic strains were reached under the conditions of higher (by 10°C) temperature, at 60-62°C, in comparison with those of their mesophilic analogues.

By applying of obtained cellulases, it is possible to receive microbial protein, fermenting monosaccharide, liquid fuel and biomass rich in protein from renewable sources and lignocellulosic material. The strain characterized by xylanase activity and zero cellulase activity, might be used in production of high quality paper.

შესავალი

უკანასკნელი 20 წლის მანძილზე მიკრობიოლოგიური სინთეზი ბიოტექნოლოგიის ერთ-ერთ ყველაზე სწრაფად და ინტენსიურად განვითარებად მიმართულებას წარმოადგენს. განსაკუთრებით დიდი ბიძგი მიკრობიოლოგიური სინთეზის სწრაფ განვითარებას მისცა გენმოდულიზირებული ორგანიზმების გამოყენებამ. არსებული მდგომარეობის მიხედვით მიკრობიოლოგიური სინთეზი აღიარებულია როგორც ერთ-ერთი ყველაზე მეცნიერებატევადი დარგი და უკვე აქტიურ კონკურენციას უწევს ქიმიურ სინთეზს ისეთ დარგებშიც, როგორიცაა დაბალმოლეკულური და ბიოლოგიურად და ფიზიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მასიური წარმოება. რაც შეეხება მაღალმოლეკულური ნაერთების ინდუსტრიას, კერძოდ ცილებს და კატალიზურად აქტიური ცილებს - ფერმენტებს, აქ მიკრობიოლოგიურ სინთეზს ანალოგი არ გააჩნია. განსაკუთრებით შეიცვალა ფერმენტების წარმოების ინდუსტრია, უკანასკნელ დროში მოძიებულმა, ახალი და მათ შორის სტაბილური ფერმენტების მეწარმე მიკროორგანიზმებმა, მნიშვნელოვნად გაზარდეს კომერციული ფერმენტების სპექტრი.

მიუხედავად მნიშვნელოვანი ძვრებისა, ფერმენტების წარმოქმნელ მიკროორგანიზმთა დიდი უმრავლესობა მიკროორგანიზმების მეზოფილურ ფორმას წარმოადგენს. სხვაგვარად რომ ვთქვათ ესენია ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმები. XIX საუკუნიდან დაწყებული, მრეწველობის სხვადასხვა დარგებში გამოიყენება მეზოფილური მიკროორგანიზმების მიერ წარმოქმნილი ფერმენტები. ამ ტიპის მიკროორგანიზმებმა და მათ მიერ წარმოქმნილმა ფერმენტებმა, მიუხედავად მათი ფართო გენეტიკური სპექტრისა, პრაქტიკულად ამოწურეს პოტენციალი, სტაბილური, კატალიზურად აქტიური მატრიცების გამოყენების თვალსაზრისით.

სხვადასხვა ბუნებრივი და სამრეწველო მიკრობიოლოგიურ ან ფერმენტულ გარდაქმნებზე აგებული ხარისხობრივად ახალი ბიოტექნოლოგიების შექმნისათვის აუცილებელი ხდება განსაკუთრებულ - ექსტრემალურ პირობებში (მაღალი ან დაბალი ტემპერატურა, მჟავა და ტუტე გარემო, მარილების მაღალი კონცენტრაცია, და სხვა) მზარდი მიკროორგანიზმების სელექცია და მათ მიერ წარმოებული

სტაბილური ფერმენტების გამოყენება. უკანასკნელი 10-15 წლის მანძილზე ნათლად იქნა ნაჩვენები, რომ ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები მოქმედებენ ექსტრემალურ პირობებში და უფრო სტაბილურები არიან, ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების მიერ წარმოქმნილ ფერმენტებთან შედარებით.

ცნობილია, რომ სხვადასხვა ტაქსონომიური ჯგუფის წარმომადგენელ მიკროორგანიზმებს ზომიერ ექსტრემალურ პირობებში შესწევთ არსებობის უნარი, რაც განპირობებულია, კრიტიკულ პირობებში, მათ გენომში სტაბილური ფერმენტებისადმი სპეციფიური გენების არსებობითა და ხშირად ჩვეულებრივისაგან განსხვავებული ნივთიერებათა ცვლის პროცესით.

მიკროორგანიზმები, როგორც ფართო სპექტრის ორგანიზმისა და რიგი ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებათა პროდუცენტები, გამოიყენებიან წარმოებაში მცირენარჩენიანი ტექნოლოგიების შესაქმნელად. როგორც გამოირკვა ეს თვისება ექსტრემოფილებსაც ახასიათებს. მრეწველობაში მთელ რიგ შემთხვევებში ექსტრემალურ პირობებს უპირატესობა ენიჭებათ ტექნოლოგიური თვალთახედვით. დიდ ინტერესს იწვევს ექსტრემალური მიკროორგანიზმების სტაბილური ფერმენტების გამოყენება კვების მრეწველობაშიც [56] მათი ბიოდეგრადირებადი ბუნების, არატოქსიკურობის და მცირენარჩენიანი ტექნოლოგიებში გამოყენების შესაძლებლობის თვალსაზრისით.

მიცელური სოკოები, როგორც ეუკარიოტული ორგანიზმები, პროკარიოტებთან შედარებით, ხასიათდებიან გენეტიკური ინფორმაციის უფრო ფართო სპექტრით, მრავალფეროვანი ორგანული მეტაბოლიტების ბიოსინთეზის და ტრანსფორმაციის უნარით.

მსოფლიოს უმეტეს განვითარებულ და განვითარებად ქვეყნებში, მათ შორის დსთ-ში კერძოდ - რუსეთში (მოსკოვი, სანკტ-პეტერბურგი), უკრაინაში (კიევი), უზბეკეთში (ტაშკენტი) - არსებული მიცელური სოკოების (მიკროსკოპული, ბაზიდიალური) კოლექციები ძირითადად მოიცავენ მეზოფილურ მიცელურ სოკოებს, რომლებიც უპირატესად გამოყოფილია ჩვეულებრივი ეკოლოგიური ნიმუებიდან.

ექსტრემოფილური მიცელური სოკოების სელექციის თვალსაზრისით ძალიან დიდ ინტერესს იწვევს კავკასიის რეგიონი. როგორც მსოფლიოში ერთ-ერთ ყველაზე ახალგაზრდა მთების მასივი, იგი ძალზედ მდიდარია ორგანიკით და შედგება 25 - ზე მეტი ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონისაგან. სამხრეთ კავკასიის მასივებზე გვხვდება პრაქტიკულად ყველა ტიპის ექსტრემალური პირობა. ამ რეგიონის განსაკუთრებული ბიომრავალფეროვნება იმის წინაპირობაა რომ რეგიონში უნდა არსებობდეს მიკროორგანიზმების ფართო სპექტრი. და ბოლოს მნიშვნელოვანია ის გარემოებაც, რომ კავკასიის რეგიონში გავრცელებული მიკროფლორა თითქმის არაა შესწავლილი.

ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიკროსკოპული სოკოების კოლექციის შექმნას, რომელშიც წარმოდგენილი იქნება კავკასიისათვის დამახასიათებელი მიცელური სოკოები, თეორიულს გარდა, სამრეწველო თვალსაზრისითაც დიდი მნიშვნელობა ენიჭება, რადგან იქმნება იმის შესაძლებლობა, რომ ჩატარდეს ცალკეული მეტაბოლიტების მეწარმე აქტიური პროდუცენტი შტამების სელექცია.

ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების ფორმებთან მიმართებაში განსაკუთრებულ ყურადღებას იმსახურებს სტაბილური ფერმენტების მეწარმე მიკროორგანიზმების სელექცია და მათი პრაქტიკული გამოყენების ბიოტექნოლოგიების შექმნა. დურმიშიძის სახელობის აგრარული უნივერსიტეტის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში (ბიოტექნოლოგიის ლაბორატორია) შექმნილი მიკროორგანიზმების კოლექცია და დაგროვილი გამოცდილება იმის კარგი წინაპირობაა, რომ შესაძლებელი იქნება სტაბილური ფერმენტების მეწარმე სოკოური შტამების სელექცია და მათი პრაქტიკული გამოყენება.

ნაშრომის მიზანი და ამოცანები

კვლევის მიზანი და ამოცანები: კვლევის მიზანს წარმოადგენდა კავკასიის სხვადასხვა ექსტრემალური ეკოლოგიური ნიშიდან გამოგვეყო მიკროსკოპული სოკოების კულტურები, კერძოდ ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტი შტამები და დაგვეხასიათებინა ამ ფერმენტების სამრეწველო გამოყენების პერსპექტივები. ამ მიზნით დასახული იქნა შემდეგი ამოცანები:

- საქართველოს სხვადასხვა ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების ახალი კულტურების მასიური გამოყოფა, ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტი შტამების უპირატესი სელექციით.

- გამოყოფილ კულტურებს შორის საძიებელი ფერმენტების პროდუცენტების გამოვლენა,

- მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა,

- ცელულაზა/ქსილანაზას აქტიური პროდუცენტები ექსტრემოფილური შტამებისათვის აქტივობის სრული პოტენციალის გამოსავლენად კულტივირების პირობების შერჩევა,

- ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებიდან ცელულაზა/ქსილანაზას ფერმენტული პრეპარატების მიღება და მათი სამრეწველო თვისებების დახასიათება.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე: შესწავლილია კავკასიის რეგიონში სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების თერმოფილური ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცირების უნარი და შექმნილია ამ ფერმენტების პროდუცენტების კოლექცია (212 შტამი). გამოყოფილ კულტურებს შორის, დადგენილია მიკროსკოპული სოკოების დომინანტი გვარები. შერჩეულია აღნიშნული ფერმენტების, აქტიური პროდუცენტები. შექმნილი კოლექციის ანალიზი საშუალებას იძლევა ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებისათვის შეფასდეს მათ მიერ სინთეზირებული ცელულაზა/ქსილანაზას ექსტრემოფილობის (ბუნებრივი კრიტიკული პირობების მიმართ) ზღვრები, ისეთ ბიომრავალფეროვნებით მდიდარ ქვეყანაში, როგორიც არის საქართველო.

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა: ცელულაზა/ქსილანაზაზე დაფუძნებული ძალზედ ფართო სპექტრის ბიოტექნოლოგიები წარმოადგენენ საიმედო, ეკოლოგიურად უსაფრთხო ბიოტექნოლოგიებს, მათ შორის მცირენარჩენიანს და ნანოტექნოლოგიებს. შექმნილი ექსტრემოფილური სოკოების კოლექცია საშუალებას იძლევა გამოვიყენოთ ახალი თერმომედეგი ცელულაზა/ქსილანაზა. ათი გრადუსი ცელსიუსით ამაღლებული თერმომედეგობა მნიშვნელოვნად ზრდის ამ ფერმენტების გამოყენების სპექტრს და იძლევა საშუალებას წარვმართოთ

პროცესები პასტერიზაციის ტემპერატურის პირობებში, როდესაც პროცესის სტერილურობა პრაქტიკულად გარანტირებულია. ნაგარაუდებია ამ სტაბილური ფერმენტების სოფლის მეურნეობაში და კვების მრეწველობაში გამოყენება.

თავი I

ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1 მიკროორგანიზმების ქსილანაზები და ცელულაზები

ჰემიცელულოზა (ქსილანი) მცენარის ერთ-ერთი სტრუქტურული კომპონენტია, რომელიც ცელულოზასა და ლიგნინთან ერთად მკვრივ, გამძლე კომპონენტს - ლიგნოცელულოზას ქმნის. ცნება, - ჰემიცელულოზები აერთიანებს უჯრედის კედლის შემადგენლობაში შემავალ პოლისაქარიდებს, რომლებიც არ იხსნებიან წყალში, მაგრამ იხსნებიან ტუტე ხსნარებში. ხუთ ნახშირბად ატომიანი შაქრებიდან შემდგარი ქსილანი გაცილებით უფრო ადვილად იშლება მონომერებამდე მინერალური მჟავებით და ფერმენტებით ვიდრე კრისტალური უბნების მქონე ცელულოზა.

ჰემიცელულოზები შედგებიან პენტოზების (ქსილოზა, არაბინოზა), უფრო იშვიათად ჰექსოზების (გლუკოზა, მანოზა, გალაქტოზა) და ურონის მჟავებისაგან. ქსილანის სტრუქტურაში მონაწილე მონომერების მიხედვით ამ ჯგუფში გაერთიანებული პოლისაქარიდები იწოდებიან: მანანებად, გალაქტანებად და პენტოზანებად (არაბანი ან ქსილანი) [19, 20, 64].

სხვადასხვა მცენარის სახეობებში ქსილანოპირანოზული ჩონჩხი შეიძლება ჩანაცვლებული იყოს არაბინოზით, მეთილირებული გლუკოზით და აცეტილური ჯგუფებით. მრავალწლიანი (მერქნიანი) მცენარეების ქსილანი (მასზე მცენარის მშრალი წონის 15-35% მოდის) წარმოადგენს 0-აცეტილ-4-0-მეთილგლუკურონოქსილანს [89, 90]. აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ C_2 და C_3 პოზიციაში ქსილოზის მრავალი OH ჯგუფი აცეტილირებულია, სადაც მოლური თანაფარდობა (ქსილოზა: აცეტილი) უდრის დაახლოებით 1 : 0,6 ტოლია [8, 38, 90].

მერქნიანი მცენარეების ქსილანის პოლიმერიზაციის ხარისხი 150-200-ია. მოლეკულის სტრუქტურა ძირითადად ხაზობრივია. გამონაკლისია C_3 მდგომარეობაში ბმული მოკლე ჯაჭვები, რომელთა რიცხვი მოლეკულაში ორის ან სამის ტოლია [99, 100]

ერთწლიანი მცენარეების (რბილი მერქანი) ქსილანი არაბინო-4-0-მეთილგლუკურონოქსილანს წარმოადგენს [80]. მერქნიანი მცენარეების ქსილანისაგან განსხვავებით იგი არ არის აცეტილირებული და სამი ძირითადი კომპონენტისაგან შედგება. ესენია: ქსილოზა, 4-0 გლუკურონის მჟავა და არაბინოზა. მოლეკულაში მათი თანაფარდობა ასეთია: 8:1, 6:1 [20].

რბილმერქნიან მცენარეებში ქსილანზე მცენარის მშრალი წონის 7-10% მოდის. მისი მოლეკულა უფრო მოკლეა, ვიდრე მერქნიანი მცენარის და ნაკლებად განტოტვილი. (ერთი ან ორი გვერდითი ჯაჭვი მოლეკულაზე) პოლიმერიზაციის ხარისხია-70-130 [7].

ცელულოზასა და ქსილანს შორის არ არსებობს ქიმიური კავშირები, ხოლო საკმაოდ მტკიცე ორმხრივი ურთიერთკავშირი განპირობებულია მრავალრიცხოვანი წყალბადური ბმებით, ვან დერ ვალსის და სხვა ძალებით [79]. რაც შეეხება ლიგნინს-ჰემიცელულოზა მას უკავშირდება ქიმიური ბმების საშუალებით. სავარაუდოა, რომ ქსილანის გვერდითი ჯაჭვებიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ლიგნინთან ქიმიური კავშირების დამყარების პროცესში [65, 66].

სხვადასხვა მცენარეული ორგანიზმებიდან მიღებული ქსილანი შეიძლება განსხვავდებოდეს ჯაჭვის სიგრძით, ფიზიკური თვისებებით, ბმების ტიპებით (რითაც მერქანში იგი უკავშირდება ლიგნინსა თუ სხვა ნახშირწყლებს). ეს მნიშვნელოვანია ქსილანის ფერმენტული ჰიდროლიზის გზების ძიებისათვის [74, 75].

ქსილანის მოლეკულის სტრუქტურის ზუსტ დადგენას ართულებს მოლეკულაში აცეტილური ჯგუფების: არაბინოზის, ურონმჟავის და სხვათა არსებობა. ქსილანის მოლეკულები ცელულოზისაგან განსხვავებით წარმოქმნიან მოქნილი სტრუქტურის მქონე ფიბრილებს, რაც მოლეკულაში CH_2OH ჯგუფების ან არსებობითაა განპირობებული. აცეტილირებულ და ურონმჟავა მოცილებულ ქსილანს შეუძლია კრისტალიზაცია ჰექსაგონალური ბურთულების ფორმით [24, 25, 63, 64, 72].

ქსილანის დაშლა მონოსაქარიდებამდე შესაძლებელია მჟავური ან ფერმენტული ჰიდროლიზის გზით. მჟავური ჰიდროლიზი ფერმენტულთან შედარებით სწრაფია, მაგრამ არასპეციფიური, რადგან თან ახლავს დაშლის

პროდუქტების წარმოქმნა. ფერმენტულ ჰიდროლიზს უპირატესობა ენიჭება მისი სპეციფიურობის გამო. ქსილანი ჰეტეროპოლიმერია, ამიტომ მისი სრული ჰიდროლიზისათვის მრავალი სხვადასხვა ფერმენტის მონაწილეობაა საჭირო. ქსილანური ფერმენტებიდან ყველაზე კარგად შესწავლილია ენდო-1,4-β-D-ქსილანაზა (EC 3.2.1.8.). ეს ფერმენტი ქსილანის ჩონჩხზე მოქმედებს ენდო-გზით და წარმოქმნის უფრო მოკლე ოლიგომერებს ქსილოზიოზასა და ნაწილობრივ ქსილოზასაც კი ეგზო-1,4-β-D-ქსილოზიდაზა (EC 3.2.1.37), β-ქსილოზიდაზა ან ქსილოზიოზა აკატალიზებს 1,4-β-D-ქსილანის ჰიდროლიზს D-ქსილოზის ნაშთის თანმიმდევრული მოშორების გზით არა-აღმდგენელი ბოლოდან. უჯრედგარე β-ქსილოზიდაზა ძირითადად სოკოური წარმოშობისაა. ის, როგორც წესი მიიღება ენდოქსილანაზასთან ერთად ქსილანის შემცველ არეზე. β-ქსილოზიდაზის ჰიდროლიზის ძირითადი პროდუქტი არის ქსილოზა. ზოგიერთ სოკოური წარმოშობის ქსილანაზურ პრეპარატში დადგენილ იქნა, რომ ერთი და იგივე ცილას გააჩნია β-ქსილოზიდაზური, α-არაბინოზიდაზური და β-გლუკოზიდაზური აქტივობები [69, 87].

ლიტერატურაში უფრო მცირეა ინფორმაცია იმ ფერმენტების შესახებ, რომლებიც ანთავისუფლებენ ჩამნაცვლებლებს ქსილანის მოლეკულას ჩონჩხიდან. ეს ფერმენტებია: α-L-არაბინოზიდაზა, α-D- გლუკურონიდაზა, აცეტილ-ქსილან ესთერაზა და სხვა. მათი მონაწილეობა აუცილებელია ქსილანის სრული ჰიდროლიზის მისაღწევად და ისინი სინერგისტულად მოქმედებენ ქსილანაზებთან ერთად [64].

ენდო-1,4-β-D-ქსილანაზა (E.C.3.2.1.8), ანუ 1,4- β-D-ქსილან ქსილანოჰიდროლაზა (ქსილანაზა) აკატალიზებს 1,4-β-D- ქსილოზიდური ბმების უწყესრიგო ჰიდროლიზს ქსილანში.

დღეისათვის საკმაოდ დიდია იმ მიკროორგანიზმების რიცხვი, რომელთაც უნარი შესწევთ მოახდინონ ფერმენტ ქსილანაზის სინთეზი და შესამაბისად მონაწილეობა მიიღონ მცენარეული ნარჩენების უტილიზაციაში. ეს ორგანიზმებია: აერობული და ანაერობული ბაქტერიები, საფუვრები, აქტინომიცეტები და სოკოები (ცხრილი 1). აღსანიშნავია, რომ ეს უკანასკნელი ამ მიმართებით ყველაზე კარგადაა შესწავლილი.

ჰემიცელულაზური ფერმენტები პირველად გამოყოფილი იყო ხის დამშლელი მიკროორგანიზმებიდან და კუჭის მიკროფლორიდან. ბაქტერიული ორგანიზმებიდან ფერმენტ ქსილანაზის სინთეზის უნარით ხასიათდებიან *Bacillus*, *Streptomyces* და *Clostridium*-ის გვარის წარმომადგენლები [23, 40, 70].

ფერმენტი ქსილანაზა მიღებული და შესწავლილია *Bacillus*, *Streptomyces* და *B.pumilus*, *Streptomyces lividans*, *S. flavogriseus*-იდან [40, 45, 55, 83, 88]. გამოვლენილია, საკმაოდ დიდი ჯგუფი ბაქტერიული ორგანიზმებისა, რომლებიც ასინთეზირებს ფერმენტ ქსილანაზას და მონაწილეობას ღებულობს ანაერობულ პირობებში მცენარეული ნედლეულის კონვერსიის პროცესში. ესენია: *Clostridium acetobutylicum*, *C. thermocellum*, *C. xylanolyticum* და *Bacteroides ruminicola* [95] .

ქსილანის ანაერობული ჰიდროლიზის პროდუქტებს წარმოადგენს: ეთანოლი, მმარმჟავა, რმემჟავა, H_2O და CO_2 [64].

კუჭის მიკროფლორაში არსებულ მიკრობთა შორის ფერმენტ ქსილანაზის სინთეზის მაქსიმალური უნარით გამოირჩევიან *Ruminococcus*-ის გვარის ორგანიზმები [63].

Clostridium xylanolyticum-ს გარდა ქსილანისა უნარი შესწევთ მოახდინოს ცელობიოზის, ფრუქტოზის, გლუკოზის, მალტოზის, მანოზის, რაფინოზის, რამნოზის, საქაროზის უტილიზაციაც. ოპტიმალური ტემპერატურა 35° pH 7.2.

ფერმენტ ენდო 1,4- β -D-ქსილანაზის სინთეზის უნარით ხასიათდებიან *Streptomyces*, *Trichosporon*, *Cryptococcus Aureobasidium*-ის გვარის საფუარები [33, 34, 40, 45, 53, 55].

პრაქტიკული თვალსაზრისით, განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება ფერმენტ ქსილანაზის პროდუცენტი სოკოების გამოვლენასა და შესწავლას. ამ მიზნით შესწავლილია *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Actemonium*, *Penicillium*-ის გვარის სოკოები [32, 90, 91].

საკმაოდ მაღალი ქსილანაზური აქტივობით ხასიათდებიან: *Acremonium tericola*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curuularia pallescens* და *Theatomium brasielense*.

რაც შეეხება *A.strictum*, *Fusarium moniliforme* და *Gonronella butleri* ისინი ნაკლებ ეფექტურები აღმოჩნდნენ, ხოლო *Humicola fuscoatra*-ს და *Paccilomyces variotis*-ს შუალედური მდგომარეობა უკავიათ ფერმენტ ქსილანაზის სინთეზის მიხედვით.

ყველა აღნიშნულ შემთხვევაში ფერმენტის სინთეზი კონსტიტუციურია [90]. როგორც ლიტერატურული მონაცემებიდან ირკვევა ქსილანაზა ინდუცირებული ბუნების ფერმენტია, წარმოიქმნება სხვადასხვა მიკროორგანიზმების მიერ, სადაც მიცელური სოკოები გამოირჩევიან როგორც ფერმენტის მეწარმენი.

ცელულოზა მცენარეული მასალის ძირითადი კომპონენტია, იგი კარგად ცნობილი და მრავალჯერ აღწერილი ბიოპოლიმერია, რომლის პოლიმერიზაციის ხარისხი საშუალოდ 1000-ზე მეტია. ცელულოზა შედგება მხოლოდ D-გლუკოზის ნაშთებისაგან, რომელიც ერთმანეთთან დაკავშირებულია β -1,4-გლიკოზიდური ბმებით [1, 177, 181]. ნატიური ცელულოზა ბოჭკოვანი სტრუქტურის მქონე ნაერთია, რომელსაც აქვს როგორც კრისტალური ასევე ამორფული უბნები [27, 181]. ცელულოზა წყალში უხსნადი ნაერთია და მხოლოდ მისი საკმაოდ ღრმა ჰიდროლიზის შედეგად წარმოიქმნებიან წყალში ხსნადი ცელოოლიგოსაქარიდები: მონო, დი, ტრი და ტეტრა შაქრები.

ცელულაზები წარმოადგენენ ფერმენტულ კომპლექსს, რომელიც ფართოდაა გავრცელებული ბუნებაში, მიკროორგანიზმებში (სოკოებში), ნაკლებად ბაქტერიებში, მცენარეებში, მცოხნავ ცხოველებში, ჭიანჭველებში (ტერმიტებში) და სხვა. ამ ჯგუფის ფერმენტების ძირითადი ამოცანაა ჰიდროლიზურად დაშალონ ფოტოსინთეზის ძირითადი პროდუქტები ცელულოზა და ჰემიცელულოზა, რათა უფრო სრულყოფილი გახადონ ნახშირბად ატომის წრებრუნვა ბუნებაში.

ფერმენტული სისტემა, რომელსაც “ცელულაზურ კომპლექსს” უწოდებენ ნომენკლატურის მიხედვით 3 შემდეგი ფერმენტისაგან შედგება, ესენია:

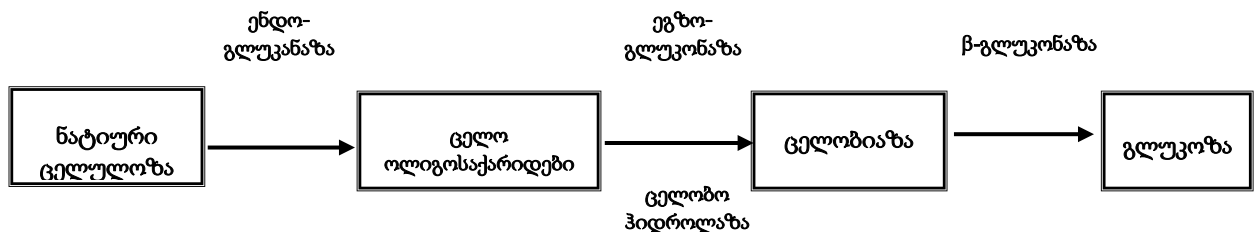
1. ენდო-გლუკანაზა [EG] ანუ ენდო-1,4- β -D-გლუკანაზა (3.2.1.4) - ენდოცელულაზა (ცელულაზა, კარბოქსილმეთილცელულაზა, ენდო-1,4- β -D-გლუკან-4-გლუკანოჰიდროლაზა, C_x). მოქმედებს ამორფულ უბნებზე, მოუწესრიგებელი მექანიზმით ახორციელებს შიდამოლეკულური β -1,4- ბმების ჰიდროლიზს შედარებით დაბალმოლეკულურ ცელოოლიგოსაქარიდებამდე (ამ ფერმენტების აქტივობა განისაზღვრება მათი უნარით წარმოქმნან აღმდგენელი შაქრები როგორც ამორფული ასევე კრისტალური ცელულოზისაგან [1, 181].

2. ეგზო-1,4- β -გლუკანაზა [CBH], (3.2.1.91). ტრივიალური სახელწოდებები - ეგზოცელულაზა, (1,4- β -D-4 გლუკან-ცელობიოჰიდროლაზა, ეგზოცელობიო-

ჰიდროლაზა, ავიცელაზა, C_1). ახდენს დისაქარიდ ცელობიოზის მოხლეჩას სუბსტრატის კრისტალური უბნებიდან, ამასთან ახასიათებს სრული უუნარობა შეამციროს კმც-ს ხსნარების სიბლანტე.

3. β -გლუკოზიდაზა (3.2.1.21) – ცელობიოზა, (1.4- β -D-გლუკოზიდ გლუკოჰიდროლაზა, ეგზოგლუკოჰიდროლაზა) ჰიდროლიზის გზით ხლეჩს გლუკოზას წყალში ხსნადი ცელოლიგოსაქარიდების და დისაქარიდების. მართალია ეს ფერმენტი უშუალოდ არ მოქმედებს ნატიურ ცელულოზის მოლეკულაზე, მაგრამ როგორც საბოლოო მოქმედი ფერმენტი აუცილებელია ცელულოზის სრული ჰიდროლიზისთვის გლუკოზამდე [1, 37, 133, 181].

ცელულოზის ფერმენტული კონვერსია გლუკოზად, მიმდინარეობს შემდეგი სქემის მიხედვით.



სქემა 1. ცელულოზის ჰიდროლიზის სქემა და ჰიდროლიზის პროცესში მონაწილე ფერმენტები

ჰიდროლიზის საბოლოო პროდუქტის გლუკოზის მიღება დამოკიდებულია, როგორც ცელულაზურ ფერმენტული კომპლექსზე ასევე სუბსტრატის მახასიათებლებზე, კერძოდ კრისტალური უბნის პროცენტულ შემადგენლობაზე [136, 181].

სოკოური წარმოშობის ცელულაზები გამოირჩევიან იმით, რომ მათ შესწევთ უნარი ცელულაზების სრული კომპლექსი წარმოქმნან, ამასთან, ცნობილია სოკოური შტამები, რომლებიც ამ ფერმენტს ბუნებაში ყველა ცნობილ ორგანიზმზე და მათ შორის ბაქტერიებზე მეტი რაოდენობით ასინთეზირებენ [181, 64]. დიდ ყურადღებას იპყრობს სტაბილური ცელულაზების ძიება. ამ თვალთახედვით ლიტერატურაში აღწერილია ცელულაზების მეწარმე ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები. ასე მაგალითად თერმო-აციდოფილური შტამი *Thermoascus*

aurantiacus-ი მაღალ ცელულაზურ აქტივობას ავლენს pH 2.9-4.5-ზე 65-760C ტემპერატურაზე [133, 144, 181].

გარდა ამისა გამოყოფილია და შესწავლილია ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების წარმომადგენელი აქტიური შტამები: *Trichoderma reesei* [37, 115, 116, 142, 145, 181] *Penicillium pinophilum* [36, 37, 145, 181], *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporum*. *Sporotrichum pulverulentum* (*Phanerochaete chrysosporium*) [37, 66, 155, 145, 181], *Talaromyces emersonii* [138, 155, 156, 145, 181], *Fusarium solani*, *Trichoderma koningii*, *Rhizopus oryzae* [37, 145, 181]. *Melanocarpus albomyces* [181]. ანაერობი სოკოებიდან ცნობილია *Neocallimastix*, *Cacomyses*, *Oprinomyces* [190, 191, 181], რომლებიც აქტიურ პროდუცენტებს წარმოადგენენ.

გამოყოფილი და შესწავლილია ასევე თერმოფილური შტამები, რომლებიც მაღალი აქტიურობით ხასიათდებიან: *Sporotrichum thermophile* (*Myceliophthora thermophila*) [145, 160, 181], *Thermoascus auranticus* [133, 144, 181], *Humicola griseus* [90, 133, 144, 181], ასევე *Humicola* sp. [91, 160, 181], *Talaromyces emersonii*, *Trichoderma viride*, *Humicola insolens*, *Chaetomium thermophile* [63, 133, 144] *T. Lignorum*, *T. Longibrachiatum*, *Aspergillus tereus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *Allecheria terrestris* [133, 144, 155, 156] და სხვები.

შესწავლილია თერმოსტაბილური ცელულაზის პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკო *Myceliophthora thermophila* (*Sporotrichum thermophile*) [160, 181], რომელიც საინტერესო აღმოჩნდა იმით, რომ ფერმენტი სტაბილურობას ინარჩუნებს pH-ის ფართო დიაპაზონში (მაღალ მჟავე და ტუტე გარემოში) 90°C ტემპერატურაზე.

თერმოფილური შტამი *Humicola insolens*-ი წარმოქმნის შვიდ განსხვავებულ ცელულაზურ კომპონენტს, ეს ფერმენტები აქტიურები არიან pH-ის ნეიტრალურ და ტუტე დიაპაზონში 7.0-10.0. ფერმენტები გამოიყენება დეტერგენტების, ქაღალდის წარმოებასა და საფეიქრო მრეწველობაში [165, 181].

ორისას მიდამოებში, „ტაფტანის“ ლოკალური ცხელი გოგირდოვანი წყლებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოებიდან, გამოვლენილი *Aspergillus*-ის 7 სახეობა მაღალ ცელულაზურ აქტივობას ავლენდა 60°C-ზე [112].

კომპოსტიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკო - *Aspergillus fumigatus* იზრდება 12-52°C დიაპაზონში. წარმოადგენს ცელულაზის პროდუცენტს.

ცელულაზის ერთ-ერთი ყველაზე აქტიური შტამი - *Trichoderma reesei*, ხასიათდება ცელულაზური სისტემის წარმოქმნის ძლიერი გენეტიკურად დეტერმინირებული უნარით. ზრდის პროცესში ასინთეზირებს სამ სხვადასხვა სახის ენდოგლუკანაზას, ორ – ცელობიოჰიდროლაზას, და β - გლუკოზიდაზას სინთეზს, რომელთა სინერგისტული მოქმედების შედეგად ხორციელდება კრისტალური ცელულოზის გლუკოზად გარდაქმნა [115, 116 142, 181].

თანამედროვე ბიოტექნოლოგიურ პროცესებში მიკროორგანიზმების ხვედრითი წილი 50%-ს აღემატება და სავარაუდოა, რომ ეს ტენდენცია კიდევ გაგრძელდება. ეს გარემოება ორი ძირითადი მიზეზით არის განპირობებული: მიკროორგანიზმების არაჩვეულებრივად სწრაფი ზრდის უნარითა და ფართო სპექტრის გენეტიკური ინფორმაციით. ამიტომ მიკროორგანიზმების კულტივირებას, როგორც მთელი პროცესის ეფექტურობის განმსაზღვრელ ფაქტორს, უაღრესად დიდი ყურადღება ექცევა.

მიკროორგანიზმების სიცოცხლისუნარიანობასა და მათ უნარზე წარმოქმნან განსაზღვრული ფერმენტები დიდი ინტესივობით, დიდად არის დამოკიდებული საკვები არის სწორად შერჩევა. კერძოდ, ნახშირბადის, აზოტისა და ფოსფორის წყაროები. მაგრამ განსაკუთრებული როლი მიკროორგანიზმების ბიოსინთეზის უნარში, მაინც მიეკუთვნება ნახშირბადის წყაროს. სწორედ ნახშირბადის წყაროს ინდუქციისა და რეპრესიის გზით ხდება ფერმენტების სინთეზის რეგულაცია.

გარემო არის ფაქტორები ასევე უმნიშვნელოვანეს გავლენას ახდენენ მიკროორგანიზმების ნივთიერებათა ცვლის ხასიათზე. აქედან გამომდინარე, კულტივირების პირობების (წნევა, ტემპერატურა, საკულტივაციო არის მჟავიანობა, აერაცია) შერჩევა არის ერთ-ერთი გზა, რათა რეგულირებული იქნას ორგანიზმის ბიოსინთეზური აქტივობა, გენეტიკურ აპარატზე ზემოქმედების გარეშე. [137]

სინთეზის რეაქციის ძირითად კომპონენტებს წარმოადგენენ დაბალმოლეკულური მეტაბოლიტები. თუმცა არეში, სადაც მიმდინარეობს კულტივირება, მინერალურ კომპონენტებისა და დაბალმოლეკულური ორგანული ნაერთების გვერდით, ყოველთვისაა მაღალმოლეკულური ნაერთებიც, რომლებიც ჰიდროლიზს განიცდიან მიკროორგანიზმების ჰიდროლიზული ფერმენტებით.

გარკვეული ფერმენტებისათვის ბიოსინთეზის უნარის ამაღლებას, უზრუნველყოფს საკვები არის ისეთი კომპონენტები როგორიცაა ნახშირბადი, აზოტი და ფოსფორი (8).

მიკროორგანიზმები სხვადასხვა ნახშირბადშემცველ ნივთიერებებს სხვადასხვანაირად ითვისებენ შედარებით მისაღებია ნახშირწყლები, მრავალატომიანი სპირტები და ორგანული მჟავები. მიკროორგანიზმები ადვილად ითვისებენ მონოსაქარიდებს – გლუკოზას, ფრუქტოზას, მანოზას, ლაქტოზას და დისაქარიდებს – მალტოზას და საქაროზას აღსანიშნავია, რომ პროდუცენტის ინტენსიურ ზრდას ყოველთვის არ შეესაბამება ფერმენტის მაქსიმალური სინთეზი.

ბევრი ავტორი აღნიშნავს, რომ გლუკოზა, რომელიც უზრუნველყოფს ბიომასის ნაზრდს, აფერხებს ფერმენტების ბიოსინთეზს.

უმეტესობა მკვლევარებისა ცელულაზებსა და ქსილანაზებს მიაკუთვნებენ მკაცრად ინდუცირებად ფერმენტებს [1, 24, 115, 116]. ფერმენტების სინთეზისათვის ინდუქტორს შეიძლება წარმოადგენდეს ფერმენტის სუბსტრატი, ან აგებულებით სუბსტრატის მსგავსი ნივთიერება.

თერმოფილური შტამი *Clostridium* sp., რომელიც კარგად იზრდება სხვადასხვა შაქრებსა და ორგანულ მჟავებზე, ცელულაზის სინთეზს ახორციელებდა მხოლოდ იმ შემთხვევებში, როდესაც საკვები არე შეიცავდა უხსნად ცელულოზას ან კმც-ს [122].

Myceliophthora thermophila-ს ცელულაზური კომპლექსის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ ის წარმოქმნის ამ კომპლექსის ყველა კომპონენტს და ახდენს ცელულოზური სუბსტრატების ჰიდროლიზს, სოკოს კულტურა 30-90 დღის განმავლობაში 50°C პირობებში ახდენს ორგანული ნახშირბადის მნიშვნელოვანი ნაწილის უტილიზაციას, ამავე დროს საკვებ არეში იზრდება აზოტის, ფოსფორისა და კალიუმის რაოდენობა. შაქრების ყველაზე დიდი რაოდენობა კულტურალურ სითხეში აღინიშნება კმც-ს, შედარებით ნაკლები ფილტრის ქაღალდისა და ყველაზე ცოტა ბამბის ჰიდროლიზის დროს. კმც-ს ჰიდროლიზის ოპტიმალური ტემპერატურაა 70°C, pH-4.8; ფილტრის ქაღალდისა - 70°C, pH-4.2; ბამბის - 55°C, pH-4.6 (234, 235). საკვები არის ძალზე მნიშვნელოვან კომპონენტს ნახშირბადთან ერთად წარმოადგენს აზოტის წყარო, კარბოჰიდრაზების პრიდუცენტი მიკრომიცეტების კულტივირებისათვის იყენებენ აზოტის როგორც ორგანულ, ისე არაორგანულ წყაროებს.

საუკეთესო აზოტის წყაროს თერმოფილური შტამების – *Aspergillus terreus* 17p და *Aspergillus terreus*-490 ცელულაზებისათვის წარმოადგენს ნიტრატული აზოტი (6, 23, 26) მსგავსი მონაცემები იქნა მიღებული ცელულაზების პროდუცენტებზე *Phoma glomerata* და *Rizoctonia solani*.

ზოგიერთი მკვლევარის აზრით ცელულაზების პროდუცენტები წარმატებით ითვისებენ როგორც ორგანულ, ისე არაორგანულ აზოტს. მაგალითად ცელულაზის პროდუცენტი ალკალიტოლერანტული შტამი *Fusarium* sp.- სათვის, აზოტის არაორგანული წყაროებიდან საუკეთესო აღმოჩნდა ამონიუმის სულფატი, ხოლო ორგანული წყაროებიდან – საფუვრის ექსტრაქტი [181]. *Trichoderma lignorum* 19 აქტიურად ასინთეზებს ცელულაზებს ასპარაგინიან, ვალინიან და გლუტამინმჟავიან არეებზე [17] თერმოტოლერანტული შტამი *Aspergillus terreus* 17p ცელულაზებს წარმოქმნიდა შესწავლილი 18 ამინომჟავიდან მხოლოდ ლეიცინის, არგინინის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის დამატებისას საკვებ არეში. ცელულაზების წარმოქმნის სტიმულირებას ზოგიერთ მიკროორგანიზმებში იწვევენ საფუვრის ექსტრაქტი, ალაოს ღივები, მიკროორგანიზმების ბიომასა ან მისი ავტოლიზატები და ფერმენტოლიზატები [18].

ლიტერატურაში არსებობს მონაცემები, რომელთა მიხედვით სიმინდის ექსტრაქტის დამატებით შეტანა საკვებ არეში დადებით გავლენას ახდენს ცელულაზების წარმოქმნაზე, მაგ.: *Aspergillus terreus* 17p, *Aspergillus terreus* AT-490 და *Sporotrichum pulverulentum*-ის საკვებ არეებში სიმინდის ექსტრაქტის შეტანა იწვევს ცელულაზების სინთეზის გაზრდას.

ფერმენტების ბიოსინთეზში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ფოსფორი. ფოსფორის როლი მეტაბოლიზმის პროცესში, იმით განისაზღვრება, რომ იგი წარმოადგენს უჯრედის აუცილებელ შემადგენელ ნაწილს. მიკროორგანიზმები მას ადვილად ითვისებენ. არეში ფოსფორის დიდი რაოდენობით არსებობის დროსაც კი ხდება, მისი სწრაფი გამოყენება.

ავტორების დიდი ნაწილი მიიჩნევს, რომ ცელულაზებისათვის ოპტიმალურ წყაროს ერთხანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმი წარმოადგენს.

მიკროორგანიზმების ზრდის რეგულაციისა და ფიზიოლოგიური აქტიურობისათვის ტემპერატურა ერთი-ერთი მნიშვნელოვანი ფაქტორია. [84]

ცელულაზების პროდუცენტი თერმოფილური კულტურა *Chaetomium thermophile* აქტიურია და სტაბილურობას ინარჩუნებს 60°C ტემპერატურაზე (204) [144]. მიკროორგანიზმების ცხოველქმედების პროცესზე ასევე დიდ გავლენას ახდენს არის მჟავიანობა. [61]

ითვლება, რომ ცელულაზები აქტივობას ამჟღავნებენ ძირითადად ნეიტრალურ და მჟავე არეში pH 4.5-5.0 (260). თერმო-აციდოფილური კულტურა *Thermoascus aurantiacus*-ი მაღალ ცელულაზურ აქტივობას ავლენს pH 2.9-4.5-ზე 65-76°C ტემპერატურაზე [144].

შტამი *Fusarium* sp.- ისათვის, რომელიც ტუტესტაბილური ცელულაზის აქტიური პროდუცენტია, ოპტიმალური pH 8.0-10.0-ის ტოლია, 60°C ტემპერატურის პირობებში [181]. სიღრმული კულტივირებისას საკვებ არის pH იცვლება ნივთიერებათა ცვლის პროცესში. საკვებ არის ყველა კომპონენტების დისოციაციის ხარისხი კი დამოკიდებულია pH-ზე. რიგ შემთხვევებში კი მიკროორგანიზმები ახდენენ არის მჟავიანობის თვითრეგულაციას.

ამდენად, მოსაზრება, რომ აციდოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები აუცილებლად უნდა ხასიათდებოდნენ მაღალი მჟავე სტაბილურობით, ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებულ ფერმენტებთან შედარებით ყოველთვის არ არის მართებული. მიუხედავად ამისა არსებობს მეტი ალბათობა იმისა რომ, აციდოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები ხასიათდებოდნენ შედარებით მაღალი მდგრადობით საინკუბაციო არის მჟავიანობის მიმართ.

ფერმენტების სინთეზზე დიდ გავლენას ახდენს ჩასათესი მასალის ასაკი. ჩასათეს მასალად გამოიყენება მყარ სუბსტრატებზე გაზრდილი სოკოების კონდიების სუსპენზია.

ფერმენტების ბიოსინთეზზე არანაკლებ გავლენას ახდენს აერაცია, კულტივირების ხანგრძლივობა და კულტურების შენახვის პირობები (1, 10, 27, 29, 260).

ფერმენტების კულტივირება ძირითადად მიმდინარეობს სიღრმული კულტივირებისას, მაგრამ ზოგ შემთხვევაში გამოიყენება ზედაპირული ან მყარფაზოვანი კულტივირების მეთოდები. სიღრმული კულტივირებისას უფრო

ხშირად ჩვეულებრივ პერიოდულ კულტივირებას ხოლო საწარმოო პირობებში უფრო მისაღებია უწყვეტი ან ნახევრად უწყვეტი კულტივირება [181] ცელულაზური ფერმენტების პროდუცენტებისათვის ოპტიმალურად ითვლება 4 დღე (96სთ) – სიღრმული კულტივირებისათვის K(250მლ ერლენ-მეიერის კოოლბაში). ტუტესტაბილური ცელულაზის პროდუცენტი შტამი *Fusarium* sp., მაქსიმალურ აქტივობას ავლენდა 96 სათიანი კულტივირების შედეგად.

ფერმენტების კულტივირება ძირითადად მიმდინარეობს სიღრმული კულტივირებისას, მაგრამ ზოგ შემთხვევაში გამოიყენება ზედაპირული ან მყარფაზოვანი კულტივირების მეთოდები. სიღრმული კულტივირებისას უფრო ხშირად ჩვეულებრივ პერიოდულ კულტივირებას ხოლო საწარმოო პირობებში უფრო მისაღებია უწყვეტი ან ნახევრად უწყვეტი კულტივირება [181] ცელულაზური ფერმენტების პროდუცენტებისათვის ოპტიმალურად ითვლება 4 დღე (96სთ) – სიღრმული კულტივირებისათვის K (250მლ ერლენ-მეიერის კოოლბაში). ტუტესტაბილური ცელულაზის პროდუცენტი შტამი *Fusarium* sp., მაქსიმალურ აქტივობას ავლენდა 96 სათიანი კულტივირების შედეგად.

ამდენად, ძალიან აქტუალურია ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების სელექცია, ნივთიერებათა ცვლის მნიშვნელობისა და გენომის ორგანიზაციის გარკვევა, კულტივირების პირობების შერჩევა. და რა თქმა უნდა ყველა ბიოსინთეტიკური პოტენციალის გამოვლენა, რომელიც მიმართულია ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების გაძლიერებულ ბიოსინთეზზე, უპირველეს ყოვლისა კი ფერმენტების.

სტაბილური ფერმენტების მიღება კი ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი პრობლემა ბიოტექნოლოგიასა და ფერმენტულ ტექნოლოგიაში. კომერციული ფერმენტების 90%-ზე მეტი მიკროორგანიზმებიდან მიიღება. მიკრობული წარმოშობის ფერმენტები ინტენსიურად გამოიყენება კვების, მსუბუქ, ქიმიურ მრეწველობასა და სამედიცინო პრაქტიკაში, ამიტომ მიკრობული წარმოშობის ფერმენტების მიღებას და პრაქტიკულ გამოყენებას მრეწველობაში განსაკუთრებით დიდი მნიშვნელობა ენიჭება.

ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატი წარმოადგენს სხვადასხვა ცილების ნარევს, რომელშიც ძირითადია ის, რომლის სახელსაც ატარებს პრეპარატი. ამ

ფერმენტული ცილის რაოდენობა ცილის საერთო რაოდენობის 20% მაინც უნდა იყოს.

სამრეწველო მიკრობული ფერმენტაციისათვის გათვალისწინებული ნედლეული რამდენიმე მოთხოვნას უნდა აკმაყოფილებდეს. მათ შორის ყველაზე მნიშვნელოვანია ის, თუ რამდენად მისაწვდომია წარმოებისათვის მისი საჭირო რაოდენობები და ფასი.

დღეისათვის მთელი რიგი ფერმენტული პრეპარატების ფართო გავრცელების ერთ-ერთ ძირითად ფაქტორს წარმოადგენს ის, რომ ისინი კარგად იხსნებიან წყალში და მშრალი პრეპარატების სახით მიღებისას არ კარგავენ მათთვის დამახასიათებელ აქტივობას.

1.2 ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები

თანამედროვე ბიოლოგიის ერთერთი მნიშვნელოვანი პრობლემაა ცოცხალი ორგანიზმების არსებობის ზღვრების დადგენა. სახეობათა მრავალფეროვნების, გავრცელების და რაოდენობის მიხედვით მიკრობული სამყარო მნიშვნელოვნად აჭარბებს დედამიწაზე არსებულ სხვა სიცოცხლის ფორმებს. ორგანულ სამყაროში მიკროორგანიზმები წარმოადგენენ ორგანიზმებს, რომელთაც უნარი შესწევთ, გარდა ჩვეულებრივი პირობებისა, იარსებონ ექსტრემალურ პირობებში (მაღალი ტემპერატურა, მჟავა და ტუტე პირობები, მარილების მაღალი კონცენტრაციები, და სხვა). ამის საშუალებას მიკროორგანიზმებს პირველ რიგში, სხვა ორგანიზმებთან შედარებით ანიჭებს სწრაფი ფიზიოლოგიური ადაპტაციის უნარი [55, 143, 157, 173, 186]. კრიტიკულ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმები იწოდებიან ექსტრემოფილებად. ექსტრემოფილები ძირითადად აერთიანებენ შემდეგ ჯგუფებს: თერმოფილებს, ფსიქროფილებს, ალკალი- და აციდოფილებს, ჰალოფილებს, ბაროფილებს, და სხვა.

მიკროორგანიზმები ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონის მიხედვით იყოფა სამ ჯგუფად: თერმოფილებად, მეზოფილებად და ფსიქროფილებად.

თერმოფილია, როგორც მცირედენ მიკროორგანიზმთა ჯგუფისათვის დამახასიათებელი მოვლენა მრავალი მკვლევარის ყურადღებას იქცევს. ინტერესს

იწვევს იმ მექანიზმების შესწავლა, რომელიც შესაძლებელს ხდის ადაპტაციის ესოდენ სწრაფ და კარგად გამოხატულ თერმოფილიის ნიშანთვისებას. პროკარიოტების და ეუკარიოტებისათვის ტემპერატურული ზღვრული დიაპაზონები განსხვავებულია. ეუკარიოტული ორგანიზმებისათვის ზრდის ზედა ტემპერატურული ზღვარი 62-65°C შეადგენს [55, 143, 157, 173, 186], ფოტოტროფული ეუკარიოტებისათვის 57°C-ს, ხოლო ბაქტერიებისათვის 75-100°C-ს და უფრო მაღალ ტემპერატურასაც [58, 67, 158]).

მართალია, ეუკარიოტულ ორგანიზმებს პროკარიოტებისაგან განსხვავებით უჭირთ 70°C-ზე მაღალ ტემპერატურაზე არსებობა, მაგრამ ისინიც საკმაოდ კარგად არიან ადაპტირებულნი ექსტრემალური გარემოს (მაღალი ტემპერატურა) მიმართ. [158]

კუნისა და ემერსონის მიხედვით თერმოფილად ითვლება მიკროსკოპული სოკოების ის კულტურები, რომელთა ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა 50°C-ზე და მინიმალური 20°C-ზე დაბლა არ არის. თერმოტოლერანტული არის ის კულტურა, რომელთა ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა 50°C-თან არის ახლო, ხოლო მინიმალური 20°C-ზე მნიშვნელოვნად დაბლაა [55].

სხვა ავტორთა განმარტებით, თერმოფილური (ობლიგატური თერმოფილი) სოკოებისათვის ზრდის მინიმალური ტემპერატურა 20°C-ია, მაქსიმალური კი 50°C-საც კი შეიძლება აღემატებოდეს, თერმოტოლერანტული (ფაკულტატური თერმოფილი) სოკოებისთვის [55, 133]. ქვედა ზღვარი შეიძლება 20°C-ის ქვევით იყოს, ხოლო მაქსიმალური კი 55°C-ს აღწევდეს. [133, 155].

მრავალი წელია ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების გამოყოფა წარმოებს ისეთი უნიკალური ნიშებიდან, როგორიცაა მზით გამთბარი ნიადაგები, თერმული ვულკანური კრატერები, კომპოსტური ორმოები, ბუნებრივად გამთბარი ნახშირის ნარჩენები, მცინვართა ყინულები, ზღვის ეკოსისტემა, მარჯნის რიფები, ქვიშის ბორცვები, გააქტივებული შლამი, მწერები და სხვა ბუნებრივი წყაროები. კონკრეტულად კი ცხელი თერმული წყლებიდან (“hot springs”) - გამოყოფენ თერმოფილურ ორგანიზმებს, ცივი არქტიკული ზღვებიდან – ფსიქროფილებს, ტუტე ტბებიდან – ალკალიფილებს, ცხელი გოგირდოვანი და მჟავე წყლებიდან

(ტბებიდან) აციდოფილებს, ბიცობი ნიადაგებისა და მლაშე ტბებიდან – ჰალოფილებს [60, 112, 155, 158, 173].

მიკროსკოპული სოკო - *Termomyces lanuginosus*-ც გამოყოფილია კარტოფილ-დექსტოზისა და ალაოს ღივების შემცველი აგარიზებული არეებიდან. კულტურა თერმოფილია და მისი ზრდის ტემპერატული საზღვრებია 30-დან 52-55°C-მდე [58, 173] ასევე ალაოს ღივების შემცველ აგარიზებული არედანაა გამოყოფილი სოკო - *Thermoascus aurantiacus*-ი, რომელიც შედგება 1მმ-მდე ზომის ბევრი სპორებისაგან (ასკოსპორებისაგან), წარმოქმნის მონარინჯისფრ-მოყავისფრო კოლონიას, იზრდება 25-45°C ტემპერატურულ დიაპაზონში და ცნობილია, როგორც ცელულაზის პროდუცენტი [58].

კომპოსტის ბინადარია თერმოტოლერანტი მიკროსკოპული სოკო-*Aspergillus fumigatus*, რომელიც აგარიზებულ პეტრის თასებზე ზდისას წარმოქმნის მორუხო-მომწვანო ფერის მარცვლოვან კოლონიებს და იზრდება 12-52°C დიაპაზონში [21, 58, 173].

სოფლის მეურნეობის შესანახი პროდუქტების თერმოგენეზის (სითბოს წარმოქმნის) პროცესის ასახსნელად, შესწავლილია ნოტიო თივის ზვინის თვითგატბობისა და თვითაალების უნარი. ავტორმა ექსპერიმენტულად დაასაბუთა, რომ საპროფიტული მეზოფილური სოკოების საარსებო გარემოში ტემპერატურის მატება ეგზოთერმული რეაქციების შედეგს წარმოადგენს. არის ტემპერატურა თავიდან 40°C-ს აღწევს, რის შედეგადაც ხდება მეზოფილური მიკროფლორის დათრგუნვა, შემდეგ, კი ტემპერატურა 60°C-მდეც აღწევს. ასეთი თივიდან მიეჩმა გამოყო შემდეგი თერმოფილური კულტურები: *Mukor pusillus*, *Termomyces lanuginosus*, *Thermoidium sulfureum* და *Thermoascus aurantiacus* [58, 173].

ანალოგიურ დასკვნამდე მივიდა კურტ-ნოაკი. მან ზომიერი კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონიდან გამოყო თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოები [133, 149, 173].

კომპოსტური პროცესის მექანიზმების კვლევისას აღწერილია 50-ზე მეტი გამოყოფილი თერმოფილური სოკო [133,157].

ტიპიური კომპოსტური პროცესის მექანიზმის არსი შემდეგში მდგომარეობს - მეზოფილური მიკრობული ზრდის შედეგად ხდება სითბოს გენერაცია,

ტემპერატურის მომატების შედეგად ითრგუნება ბაქტერიები და განვითარებას იწყებენ თერმოფილური სოკოების სპორები. თვითგათბობადი მასალიდან (ჩიტის ბუდეები, მზით გამთბარი ნიადაგები) გამოყოფილი მიკრომიცეტების ზრდა მიმდინარეობს კომპოსტზე არის გათბობის პირობებში და მდგრადობას ინარჩუნებს მაღალ ტემპერატურულ ფაზაში [58, 133, 173].

მრავალი მეცნიერის მიერ დემონსტრირებულია თერმოფილური სოკოების გავრცელება იმ ნიადაგებში, რომელიც თბება მზის სხივების საშუალებით [12, 28, 174]

ნიადაგებში, სადაც იზრდებიან თერმოფილური სოკოები, მაღალი ტემპერატურა ნარჩუნდება მხოლოდ განსაზღვრული დროით. თერმოფილური სოკოების სასიცოცხლო ციკლის მნიშვნელოვანი ნაწილი მიმდინარეობს მეზოფილურ სახეობებთან ერთად, რომელთაც მეზოფილური ბუნების გამო მათ მიმართ აქვთ უპირატესობა. თუ თერმოფილური სოკოების სპორები ჩამოყალიბებულია და მომწიფებულია ტემპერატურაზე, რომელიც გაცილებით მაღალია ამ სოკოების მინიმალურ ტემპერატურაზე, მომავალში ეს კულტურები მინიმალური ტემპერატურის დასაშვები ზღვარის ქვემოთაც კი ინარჩუნებენ სიცოცხლისუნარიანობას და რჩებიან ასეთი მრავალი წლის განმავლობაში მეზოფილური ტემპერატურის პირობებშიც [55, 192].

უკანასკნელ წლებში აქტიურად მიმდინარეობს თერმოფილური სოკოების გამოყოფა სასუქიანი ნიადაგის კომპოსტებიდან, სამთო კარიერებიდან, ქვანახშირის მალაროებიდან, სანაპირო ქვიშიდან, ბირთვული რეაქტორების ნაჟურებიდან, მკვდარი ზღვის მიმდებარე ველებიდან, საუდის არაბეთის უდაბნოს ნიადაგებიდან [55, 143, 157, 157, 176, 179, 186].

მრავალი სამეცნიერო კვლევა ეძღვნება თერმოფილების ძიებას ბუნებრივ თერმულ საბადოებში. ინდოეთში ორისას მიდამოებში, „ტაფტანის“ ლოკალური ცხელი გოგირდოვანი წყლებიდან გამოყოფილია მიკროორგანიზმების (ბაქტერიები, აქტინომიცეტები, სოკოები) 33 თერმოფილური კულტურა [155, 156].

მრავალი წლის მანძილზე აშშ-ს “ნაციონალური ყვითელმიწა პარკი”-ის გეოთერმული წყაროების მიმდებარე ნიადაგები ითვლებოდა უნაყოფო, სტერილურ რეგიონად [55, 143, 157, 176, 179, 186]. ამ ნიადაგებში გოგირდწყალბადისა და

სულფიდების ჟანგვის შედეგად წარმოიქმნება გოგირდმჟავა, რის გამოც pH-ის მნიშვნელობა 2.7-ს აღწევს, ტემპერატურა კი 70°C-მდე იზრდება. აღნიშნული ეკოსისტემისათვის დამახასიათებელია მეჩხერი მცენარეული საფარი და ნახშირბადის შეზღუდული შემცველობა. უკიდურესად ექსტრემალური პირობების მიუხედავად, გეოთერმული წყაროების მიმდებარე ნიადაგების მიკრობიოლოგიური შესწავლით გამოყოფილია თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოები. აღსანიშნავია, რომ ბაზიდიალური სოკოების არცერთი კულტურა არ გამოვლენილა. (ლიტ. თითქმის არ არსებობს ცნობა ბაზიდიალური სოკოების ექტრემოფილობის შესახებ). გამოყოფილი 16 კულტურა, მიეკუთვნებოდა მიკროსკოპული სოკოების კლასებს: *Deuteromycetes*, *Ascomycetes* და *Zygomycetes*. გამოყოფილი სოკოებიდან 2 აღმოჩნდა თერმოფილური კულტურა - *Acremonium alabamenense* და *Dactyllaria constrictum* var. *gallopava*, რომელთათვისაც ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა იყო 55°. 6 კულტურა - თერმოტოლერანტი (*Absidia cylindrospora*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2, *Penicillium* sp. 3), ეს კულტურები იზრდებოდნენ pH 3.0-6.0 დიაპაზონში. [32, 112]. გამოყოფილი 16 კულტურიდან მხოლოდ სამ კულტურას შესწევდა 0-დან 20°C-მდე ტემპერატურაზე ზრდის უნარი. საინტერესო შედეგები იქნა მიღებული აღნიშნული პარკის გეოთერმული ნიადაგების მიკრობიოლოგიური კვლევის პროცესში, რომელიც 12 თვეს გრძელდებოდა, კერძოდ, *Penicillium* sp. 4 გამოყოფილი იქნა ისეთი ზონიდან, სადაც ტემპერატურა იცვლებოდა 20-40°C-მდე, ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა კი იყო 20°C-ზე დაბალი.

თერმოფილური კულტურები - *Acremonium alabamenense* და *Dactyllaria constrictum* გამოყოფილია, როგორც 20°C-ზე დაბალი, ასევე 40°C-ზე მაღალი ტემპერატურის მქონე ნიადაგებიდან, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ თერმოფილურობის მიუხედავად, ამ კულტურების სპორები სიცოცხლისუნარიანობას დაბალ ტემპერატურაზეც ინარჩუნებენ. საგულისხმოა, რომ “ნაციონალური ყვითელმიწა პარკი”-ის გეოთერმული ნიადაგებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები განსხვავდებიან მსგავსი სახეობის სხვა წარმომადგენლებისგან, გარემოს ცვალებად პირობებთან ადაპტაციის მაღალი

უნარით, რაც განაპირობებს მათ ტოლერანტობას pH-ის ფართო დიაპაზონში ტემპერატურის ცვალებადობაზე [32, 42, 157].

ამავე ავტორების მიერ აღწერილია საინტერესო მოვლენა, კერძოდ, აქტიური ლპობის პროცესში მყოფ ხის კუნძიდან, რომლის ტემპერატურა იყო 107°C, გამოყვეს მიკროსკოპული სოკო, რომელიც ლაბორატორიულ პირობებში ამ ტემპერატურაზე აღარ იზრდებოდა. კულტურა არ არის იდენტიფიცირებული [157].

მსგავსი ინფორმაციები წარმოდგენილია ბროკისა და სხვა მკვლევარების პუბლიკაციებშიც: თერმოფილური სოკოების გავრცელების ეკოლოგიური პირობების შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ კომპოსტიური გარემოდან, სადაც ტემპერატურა 80°C-ს აჭარბებდა, გამოყოფილი სოკოებისათვის ლაბორატორიულ პირობებში ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა 60°C-ია [43, 158, 88].

აღბათ მხედველობაშია მისაღები ის ფაქტი, რომ ლაბორატორიულ პირობებში მიკროორგანიზმების მაქსიმალური ზრდის სიჩქარე არის უფრო მაღალ ტემპერატურაზე, ვიდრე ბუნებრივ პირობებში (სოკოების გამოყოფის ადგილი).

ამავდროულად, ცოცხალი ორგანიზმების თერმომედეგობა მნიშვნელოვნად აჭარბებს ბიოკინეტიკური ზონის საზღვრებს. თუ თერმოფილების შემთხვევაში, მათი უნარი იარსებონ მაღალ ტემპერატურაზე დეტერმინირებულია გენომით, მეზოფილების თერმომედეგობა განპირობებულია მიკროორგანიზმების ადაპტაციით გარემოს არახელსაყრელ პირობებში, რაც ორგანიზმს არსებული ფერმენტული სისტემების მოქმედების შედეგი უნდა იყოს, ხოლო ფერმენტული სისტემების ინდუქტორი მაღალი ტემპერატურაა. უნდა აღინიშნოს, რომ ამასთანავე მიკროორგანიზმების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა, და პირიქით სიცოცხლუნარობა დაკავშირებულია ცალკეული უჯრედული კომპონენტების თერმოლაბილურობასთან.

ამდენად, მოყვანილი მაგალითები მოწმობენ, რომ ძალზედ იშვიათ შემთხვევაში თერმომედეგი ორგანიზმები არ უნდა მივაკუთვნოთ თერმოფილურ ორგანიზმებს.

მიკროორგანიზმები, რომელთა ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა 15°C-ზე დაბალია, მაქსიმალური – კი 20°C-მდე აღწევს. ფსიქროფილურ მიკროორგანიზმებს წარმოადგენენ. ისინი ფიზიოლოგიური მაჩვენებლებით ჭეშმარიტი

ექსტრემოფილები არიან, რადგან მდგრადობას იჩენენ არა მხოლოდ დაბალი ტემპერატურულ რეჟიმში, არამედ არსებობენ როგორც ზღვების სიღრმეებში და ყინულებში, მლაშე გარემოში (მაგ.: მარინადში) და მაღალი რადიაციული გამოსხივების პირობებშიც. გარდა ამისა, ამ ორგანიზმების არსებობა დადგენილია თოვლში, გრილ და ცივ კლდის ნაპრალებში და ა.შ. ამის მიხედვით იყოფიან: ბარო- ანუ პიეზო-ფსიქროფილებად, ჰალო-ფსიქროფილებად და ტროგლო-ფსიქროფილებად (გამოქვაბულების ბინადარნი).

ფსიქროფილურ მიკროორგანიზმებს შორის გვხვდებიან: ბაქტერიები, არქიბაქტერიები, საფუვრები, სოკოები, წაყალმცენარეები (ზოგიერთი სხვა მცენარეც), პროტოზოა და სხვა უხერხემლოები. მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოვლენილია *Penicillium*-ის და *Cladosporium*-ის გვარის წარმომადგენლები [68]

ქართველი მეცნიერების მიერ ყაზბეგის რაიონის ალპური ზონის ნიადაგებიდან გამოყოფილია მიროსკოპული სოკოების 57 კულტურა. ფსიქროფილებს ძირითადად ეკუთვნოდნენ *Fusarium*-ის გვარის წარმომადგენლები (სტცუ პროექტი P-196, ბიოლოგიური მრავალფეროვნება, ახალ ბიოტექნოლოგიებში გამოყენების მიზნით, 2006წ.).

ფაკულტატურული ფსიქროფილები იზრდებიან დაბალ ტემპერატურაზე, მაგრამ მათი მაქსიმალური ტემპერატურა გაცილებით მაღალია, ვიდრე ობლიგატური ფსიქროფილების. მათ ასევე უწოდებენ სიცივემედეგს ან ფსიქროტოლერანტს [5]

ხშირად ფსიქროფილები და მეზოფილები ხასიათდებიან ერთნაირი ტემპერატურული რეჟიმით სავარაუდოდ მიკროორგანიზმების ამ ჯგუფებს შორის განსხვავება საძიებელია მათ ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიურ თვისებებში [87, 22]

ამდენად, მცნება ფსიქროფილი ჯერ კიდევ არ არის მკვეთრად განსაზღვრული. აქედან გამომდინარე, ასევე არ არის სრულად ახსნილი დამოკიდებულება ზრდის სიჩქარესა და ტემპერატურულ მერყეობას შორის.

ცნობილია, რომ მჟავე და ტუტე პირობები ერთ-ერთი ძირითადი პარამეტრებია, რომლებიც განსაზღვრავენ მიკროორგანიზმების გავრცელებას.

ძირითადად მიკროორგანიზმების ზრდა-განვითარება ხდება ნეიტრალურ და ნეიტრალურთან ახლო pH-ის მნიშვნელობაზე, თუმცა არსებობს მიკროორგანიზმები რომლებიც იზრდებიან ნეიტრალურიდან საკმაოდ დაშორებულ p -ზე [70]

სავარაუდოა რომ, მიკროორგანიზმების უჯრედების მდგრადობა მჟავიანობის ან ტუტეიანობის მიმართ აიხსნება მათი სტრუქტურული და მეტაბოლური განსაკუთრებულობით.

მრავალი მკვლევარის მოსაზრებით აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH ხშირად არ შეესაბამება გარემოს მჟავიანობას. ყველაზე აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH-იც კი ხნდახან ოდნავ უახლოვდება დაბალ pH-ს. (pH-5,0), მაშინ როდესაც მათი ზრდის pH ოპტიმუმი არის pH-2.0 [12, 174]

შეხედულება უჯრედშიდა pH-ზე, როგორც თეორიულად აუხსნელ პრობლემაზე, საუკეთესოდ წარმოაჩინა სისომ და პონტენმა, კერძოდ:

“იქმნება შთაბეჭდილება რომ, ცნებას - უჯრედშიდა pH-ს აქვს თავისი საკუთარი, მხოლოდ მისთვის დამახასიათებელი მნიშვნელობა. ეს განპირობებულია არსებული კავშირით pH სისტემასა და ფერმენტატულ კინეტიკას შორის. თუმცა არსებობს ვარაუდი რომ ფერმენტატული რეაქციები მიმდინარეობს მცირე მოცულობის პროტოპლაზმის უბნებში განსაზღვრული მემბრანებით, ხოლო ასეთ სისტემებში ტერმინს <pH> ერთობ საეჭვო მნიშვნელობა ენიჭება.”

პროკარიოტულ სამყაროში აციდოფილების მრავალი წარმომადგენელია თერმოფილი, რადგან ისინი თერმული - გოგირდოვანი წყლების ბინადრებს წარმოადგენენ. *Sulfolobus* გვარის არქიბაქტერიები, იზრდებიან 1.0-5.8 pH-ის დიაპაზონში და მათი ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა 70°C. ცნობილია ამავე გვარის აციდოფილური არქეები, რომელთა ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმი 80°C [21] შლეპერმა მიკროორგანიზმების ამ ტაქსონომიური ჯგუფს შემატა ორი ახალი სახეობა - *Picrophilus oshimae* და *P. torridus*. [164]

ლიტ. წყაროებიდან ცნობილია რომ, მჟავე pH-ის მიმართ ყველაზე მდგრადი ორგანიზმებია მიკროსკოპული სოკოები [164].

ჯერ კიდევ 1943 წელს ვაკსმანის მიერ გამოკვლეული იქნა, რომ მიკროსკოპული სოკოები *Acontium velatium* და *Cephalosporium* იზრდებიან 2.5 N გოგირდმჟავასთვის [171].

აღწერილია ზოგიერთ ობის სოკოს და ბაქტერიას: *Candidum caldarium*, *Acontium cylatium*, *Cephalosporium spp.*, და *Trichosporon cerebriae* უნარი გაიზარდონ უკიდურესად

მჟავა pH-ზე, კერძოდ pH 1.0-ზე. ეს არის pH – ის ზღვარი, სადაც ჩვეულებრივ მიკროორგანიზმები წყვეტენ ზრდა-განვითარებას [8, 33]

თერმოაციდოფილებს წარმოადგენენ “ნაციონალური ყვითელმიწა პარკის”-ის გეოთერმული ნიადაგებიდან გამოყოფილი *Aspergillus*-ის, *Abzidia*-სა და *Penicillium*-ის გვარის სახეობები [157]

სპილენძის საბადოებიდან გამოყოფილია, აციდოფილური სოკოების 26 სახეობა, რომლებიც მიეკუთვნებოდნენ *Aspergillus*-ის, *Penicillium*-ის და *ღჰიზოპუს*-ის გვარს. დღეს ამ კულტურებს წარმატებით იყენებენ მინერალებიდან სპილენძის მოპოვების პროცესში [154]

სპილენძის საბადოებიდან გამოყოფილია, აციდოფილური სოკოების 26 სახეობა, რომლებიც მიეკუთვნებოდნენ *Aspergillus*-ის, *Penicillium*-ის და *Rhizopus*-ის გვარს. დღეს ამ კულტურებს წარმატებით იყენებენ მინერალებიდან სპილენძის მოპოვების პროცესში [154]

ალკალიფილური მიკროორგანიზმების უმრავლესობა ბაქტერიებია, თუმცა მიკროსკოპულ სოკოებშიც გვხვდება ექსტრემოფილები ამ ნიშნით. სხვადასხვა გვარის მიკროსკოპული სოკოები განსხვავებულად რეაგირებენ მაღალ და დაბალ pH- ზე. თუმცა უნდა აღინიშნოს რომ, უმეტესი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები ბაქტერიებისაგან განსხვავებით იზრდებიან pH- ის ფართო დიაპაზონში – 2.0-დან 11.0-მდე, განსაკუთრებით კი *Aspergillus*-ის, *Penicillium*-ის და *Fusarium*-ის გვარის წარმომადგენლები [180, 182].

აფრიკის ტბებიდან: „მანიერა“, „სუმი“ და „ნაკურუ“, და ჩინეთში არსებული ტბიდან „The Baer Soda Lake“ გამოვლენილია როგორც ალკალიფილური და ასევე ჰალოფილური მიკროორგანიზმები (პროკარიოტები და ეუკარიოტები). ეს ტბები ხასიათდება ნატრიუმის ბიკარბონატის (NaHCO_3) მაღალი შემცველობით, და შესაბამისად ტუტე და მლაშე პირობებით [60].

კლადვანგმა კოლეგებთან ერთად ტაილანდის ტყეების მიკრო გარემოს ნიადაგიდან (ფოთლების გროვიდან და მერქნოვანი მასალიდან) გამოყო მიკროსკოპული სოკოების 500 კულტურა, რომელთაც უნარი შესწევთ ისეთ პირობებში გაზრდისა, სადაც pH 9.0- ზე მეტია. სოკოების გამოსაყოფად საწყის

არეებში სუბსტრატს წარმოადგენდა ამილოზა, ცელულოზა და მანანები. არის pH იცვლებოდა 7.0-9.0 დიაპაზონში.

ტაილანდელი მეცნიერების კვლევის შედეგებმა აჩვენეს, რომ ექსტრემალური კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმებს შორის სჭარბობს ექსტრემოფილური კულტურები [112].

მიკროორგანიზმთა განსაკუთრებულ ჯგუფს წამოადგენს მლაშე ეკოსისტემების ბინადარი – მარილის მოყვარული ჰალოფილური ფორმები.

გასული საუკუნის 70-80-იან წლებიდან ბუნებრივ გეოცენოზში ინტენსიურად დაიწყო ჰალოფილების გავრცელების არეალის შესწავლა. ასევე უკანასკნელი წლების მონაცემებით გაიზარდა ინტერესი ჰალოფილური მიკროორგანიზმების მიმართ. ასეთი მიკროორგანიზმები ხასიათდებიან მინიმუმ ორი განსაკუთრებული თავისებურებით: გააჩნიათ ციტოპლაზმური სტრუქტურის გამლიერებული მდგრადობა მაღალი კონცენტრაციის იონების მიმართ და არეგულირებენ იონების შეღწევადობას მემბრანის გავლით.

ზოგიერთ მიკროორგანიზმს, მათ შორის სოკოებსაც შესწევთ უნარი ისეთ მძაფრ გარემო პირობებში არსებობისა, სადაც წყლის აქტივობა დაბალია (მარილების მაღალი კონცენტრაცია, გვალვა ან გაყინული წყალი). მათი ადაპტაციის უნარი განპირობებულია ამ ორგანიზმების ოსმოფილური ბუნებით. ისინი სტრესულ გარემო პირობებში (მარილების მაღალი კონცენტრაცია, ექსტრემალური ტემპერატურა, გაყინვა-გადნობა და გამოშრობა) უჯრედის მემბრანის გასწვრივ ინარჩუნებენ ოსმოსურ წონასწორობას, შეთავსებადი ხსნარების - ოსმოლიტების (მაგ. გლიცეროლი) აკუმულაციის ხარჯზე [113, 121, 159, 196]

არსებობს ოსმოფილების ორ ჯგუფი: 1. ქსეროფილები -იზრდებიან ოგანული საქაროზას, ან გლიცეროლის შემცველ არეებზე და მარილების მაღალ კონცენტრაციას ეგუებიან უჯრედში სხვადასხვა ორგანული მჟავების (ოსმოლიტების) აკუმულაციის ხარჯზე; 2. ჰალოფილები იზრდებიან გარემოში, სადაც დომინირებს Na-ის და Mg-ის იონები [60]

განსაკუთრებული ექსტრემალური ჰალოფილურობით არქიბაქტერიები გამოირჩევიან, აღმოჩენილია მათი ახალი სახეობები *Halogeometricum* [140]

Haloterrigena, *Haloferax*. თუმცა სხვადასხვა მიზეზთა გამო მათი შემდეგი კვლევა არ ხერხდება. *Haloarcula* [104, 140]

სხვადასხვა მკვლევარის მიერ დახასიათებული და შესწავლილია სხვადასხვა ტიპის მლაშობები, საიდანაც გამოყოფილია მიკროსკოპული სოკოები, ასეთი მზიანი მლაშობებია: ესპანეთში „სანტაპოლა“ და ისრაელში „ელიატი“ [83]

1977 წელს, კრონინმა და პოსტმა, პირველებმა დაიწყეს მლაშე გარემოს შესწავლა. იუტაში, “დიდი მლაშე ტბის” სანაპირო ზოლიდან გამოყვეს სოკო, რომელიც იზრდებოდა ტბაში ჩაძირული ფიჭვის ნაფოტებზე და მიეკუთვნებოდა *Cladosporium*-ის გვარს [57]

მოგვიანებით 1998 წელს, ბუხალომ თანამშრომლებთან ერთად მკვდარი ზღვის მიდამოებიდან, რომელიც მდიდარია Mg- ის მარილებით, გამოყო და შეისწავლა ჰალოფილური მიცელიური სოკო *Gymnascella marimortui* რომელიც განეკუთვნა ასკომიცეტების რიგს [46] მისი ზრდის ოპტიმალურ პირობას წარმოადგენდა წყალში არსებული მარილების მაღალი კონცენტრაცია, 10-30%-ის შემცველობით, და წარმოადგენდა ობლიგატურ ჰალოფილს. სხვა მეცნიერების მიერ [109, 110]

მკვდარი ზღვიდან (მლაშობია და მდიდარია Mg- ის იონებით) გამოყოფილი და შესწავლილი იქნა შემდეგი კულტურები: *Aspergillus versicolor*, *Chaetomium globosum*, *Eurotium herbariorum*, *E. amstelodami*.

რუის-სუარესმა მაიაგუეზის ყურის სანაპიროს ქვიშების მიკრობიოლოგიის შესწავლისას დაადგინა რომ, ზღვის სანაპიროზე დომინირებს *Aspergillus*- ის გვარის წარმომადგენლები [161] შემდეგ წელს კი ნიევეს-რივერასთან ერთად გამოყო ჰალოფილური მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა გვარები: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Dreschlera*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* და *Rhizopus*. აღმოჩნდა, რომ შექმნილ კოლექციაშიც დომინირებდა *Aspergillus*-ის გვარის სახეობები. ეს ავტორები ასაბუთებენ, რომ სანაპირო ზოლში სოკოების სახეობრივი შემადგენლობა და რაოდენობა პირდაპირ კავშირშია ზღვის წყალში არსებული მარილის კონცენტრაციასთან [148]

პუერტო-რიკოში, „კაბო როჯოს“ მარილის საბადოებიდან (მიმდინარეობს მარილის კომერციული წარმოება) გამოყოფილი და დახასიათებულია ჰალოფილური და ჰალოტოლერანტული სოკოები.

გამოყოფა ხდებოდა ალაოს ღივებისა და კარტოფილის დექსტროზის შემცველ საკვებ არეებზე 15% NaCl-ის თანაობისას. იდენტიფიცირებულია 8 სხვადასხვა გვარის 17 სახეობის სოკო: *Alternaria* sp. *Aspergillus elegans*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. oryzae*, *A. japonicus*, *A. niger aggregate*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Eurotium amstelodami*, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *Stemphylium* sp. და სხვა. გამოყოფილი სოკოების დიდი ნაწილი ტოლერანტულობას ავლენდა, არის NaCl-ის 30%-იანი კონცენტრაციის პირობებში, ტემპერატურისა და pH-ის ფართო დიაპაზონში, შესწავლილი იქნა მათი მეორადი მეტაბოლიტების წარმოების უნარი ყველაზე დიდი სიხშირით გამოვლინდა *Aspergillus*-ის გვარის სახეობები, თუმცა გამოვლენილი იყო ასკომიცეტების კლასის სხვა გვარების სახეობები და ასევე ბაზიდიომიცეტების კლასის წამომადგენლები.

ჰალოფილური სოკოები აღმოჩენილი და გამოვლენილია პოლარული (არქტიკული) ყინულებშიც. აღმოჩნდა რომ მსგავსი სახეობების არსებობა შესაძლებელი იყო როგორც მლაშე წყლებში, ასევე არქტიკის სანაპირო ზოლში. გამოვლენილ დომინანტურ სახეობებს შორის იყვნენ ჰალოფილური შავი საფუარი: *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmatostroma salinum*, ჰალოტოლერანტობას ავლენდნენ *Aureobasidium pullulans* (144) [83] და *Cladosporium*-ის გვარის სხვადასხვა სახეობები (156) [97] და *Eurotium*-ის გვარის წამომადგენლის *teleomorphic xerophilic* ექვსი ნაირსახეობა (102), ასევე ბაზიდიომიცეტების *Wallemia*-ს გვარის სამი წამომადგენელი. ამ პირობებში *Aspergillus*-ის და *Penicillium*-ის შეხვედრის სიხშირე იყო ნაკლები [82, 192]

პოლარული (არქტიკული) მდნარი ყინულებიდან გამოყოფილი ოსმოფილური სოკოების შესწავლისას ვარაუდობდნენ, რომ ისინი მძაფრ ექსტრემალურ გარემოს უზრუნველყოფენ საკვები კომპონენტებით.

ჰალოტოლერანტული სოკოების გავრცელების კიდევ ერთ არეალს წარმოადგენს მარილიანი ჭაობები. აბდელ-ჰაფეზის აზრით, ასეთ ჭაობებში, სოკოები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ მცენარეული ნედლეულის გახრწნაში [19] ევროპის

ამ ტიპის მლაშობებში ნაპოვნია მიკროსკოპული სოკოების სპორები, რომელთა 80% იდენტიფიცირებული იყო, როგორც სახეობა *Glomus eosporum*-ის წარმომქმნელი [94]. მარილიანი ჭაობების მიკორიზული მცენარეებიდან გამოყოფილია *Glomus*-ის გვარის სხვა სახეობებიც [120]

პორტუგალიის ჭაობების შესწავლისას კორვალჰომ თანამშრომლებთან ერთად დაასაბუთა რომ ჭაობის მცენარეების ტოლერანტობას მარილის მაღალი კონცენტრაციების მიმართ უზრუნველყოფს *Glomus*-ის გვარის მიკორიზული სოკოების არსებობა და ადაპტაცია მარილის მაღალი კონცენტრაციის მიმართ [50]

კანადაში კარბონატული ნიადაგებიდან („სოდოვანი მხარიდან“) გამოყოფილი იქნა მიკროსკოპული სოკოები (ასკომიცეტების გვარიდან). NaCl-ის მაღალი კონცენტრაციით გამოწვეული სტრესის მექანიზმის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ ზოგიერთი სახეობა -სტრესული ფაქტორის საპასუხოდ - უჯრედში ინტენსიურად აგროვებს დისაქარიდ ტრეგალოზას [39] ერთ-ერთი კულტურა *Aspergillus nidulans*-ი NaCl-ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად იწყებს სხვა „ოსმოლიტების“ გლიცეროლისა და ერიტროტოლის სინთეზს.

ზემოთ ჩამოთვლილ ლიტერატურაში არსებული ინფორმაციის ანალიზი აჩვენებს, რომ მრავალ ქვეყანაში მრავალი მეცნიერის მიერ შექმნილია მიცელური სოკოების კოლექცია. აუცილებელი აღნიშვნის ღირსია ის ფაქტი, რომ ყველა ეს კოლექცია მოიცავს მიცელური სოკოების ისეთ სახეობებს, რომლებიც ერთი ან ორი ნიშნით არიან ექსტრემოფილები.

ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმებიდან გამოყოფილ ფერმენტებს კი უნარი შესწევთ სხვადასხვა კრიტიკულ პირობებში მოხვედრისას იყვნენ აქტიურები და სტაბილურები. ამრიგად, ექსტრემოფილები წარმოადგენენ ექსტრემო-ფერმენტების ანუ კრიტიკული პირობებისადმი მდგრადი ფერმენტების პროდუცენტებს.

ზემოთ მოყვანილი მსჯელობა მიუთითებს იმაზე, რომ ამჟამად მიღებული კრიტიკული კრიტერიუმების მიხედვით ახალი, სტაბილური ფერმენტების ძიება განსაკუთრებით მიზანშეწონილია იმ მიკროორგანიზმებში, რომლებიც არაჩვეულებრივი პირობების ბინადარნი არიან. ასეთ შტამების სელექციის შედეგა შესაძლებელი ხდება “უჩვეულო” ფერმენტების სელექცია, რომლებიც

დაკავშირებულია ახალ ტექნოლოგიური პროცესების ჩამოყალიბებასთან; ხასიათდებიან ამაღლებული მედეგობით ერთი ან რამდენიმე კრიტიკული გარეგნული ფაქტორის მიმართ და ამავედროულად საკმაოდ დიდ მეცნიერულ ინტერესს წარმოადგენენ, როგორც განსაკუთრებულად სტაბილური პოლიმერული მატრიცები.

ერთ-ერთი ძირითადი მიზეზი რის გამოც მიმდინარეობს სტაბილური ფერმენტების მეწარმე მიკროორგანიზმების ძიება და შემდგომი სელექცია, გახლავთ ის, რომ სტაბილური ფერმენტების გენები შესაძლებელია ეფექტურად იყოს კლონირებული სხვა არატოქსიურ და არაპათოგენურ, სწრაფად მზარდ და გენეტიკურად კარგად შესწავლილ მიკროორგანიზმებში სუპერსინთეზის მქონე შტამების მისაღებად.

თავი II

კვლევის მასალები და მეთოდები:

2.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა.

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა საქართველოს სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები.

მიკროსკოპული სოკოების კულტურების გამოსაყოფად თავდაპირველად აღნიშნული ზონებიდან ავიღეთ 10-10 გასაშუალებული ნიმუში. (ნიადაგების ნიმუშები აღებულია 50სმ რადიუსში - ხუთი სხვადასხვა ადგილიდან, 15სმ სიღრმიდან).

მიკრობიოლოგიური ჩათესვის წინ ვახდენდით ნიადაგის ნიმუშების წინასწარ დამუშავებას, რათა მიგვეღო სუსპენზია, რომელშიც მიკროორგანიზმები იქნებოდნენ ცალკეულ, თავისუფლად მოცურავე უჯრედების სახით. ეს მიღწეულ იქნა ნიადაგის აგრეგატების დისპერგირების, მიკროორგანიზმთა უჯრედების დესორბციის და მიკროკოლონიების ცალკეულ შემადგენელ უჯრედებად დაყოფის გზით [6]. დამუშავებული ნიადაგის ნიმუშების ჩათესვას ვახორციელებდით ვაკსმანის ნიადაგების განზავების მეთოდითა [184] და ნიადაგის პირდაპირი ჩათესვის მეთოდით [183]. ვიღებდით შემდეგ განზავებებს - $1/10$, $1/100$, $1/1000$, $1/10000$ - იმისათვის რომ სუსპენზიის თითოეულ თავისუფლად მოცურავე უჯრედს საკვებ არეზე მოხვედრისას მოეცა კოლონია. შევარჩიეთ სელექტიური საკვები არეები სხვადასხვა პრინციპით.

1. ენერგიის სპეციფიური წყაროების შემცველი საკვები არეები, რომლებიც ხელმისაწვდომია მხოლოდ მიკროორგანიზმთა გარკვეული ჯგუფისათვის (ცელულოზა, სახამებელი).

2. საკვები არეები, რომლებიც შეიცავენ სპეციფიკურ ქიმიურ ნაერთებს (ზრდის ინჰიბიტორებს) და არატოქსიკურ ნივთიერებებს, რომლებიც მეტაბოლიზმში მონაწილეობას არ იღებენ, მაგრამ ცვლიან არის პირობებს

(მჟავიანობას, ტუტეიანობას). ზემოთ აღნიშნული პრინციპების შესაბამისად შერჩეულ იქნა 6 საკვები არე.

საკვები არეები:

1. უნივერსალური არე - შემადგენლობა 1ლ-ზე: 0,5ლ ლუდის ბადაგი 7⁰B, 0,5ლ ონკანის წყალი, 20,0გ აგარ-აგარი. (pH 5.5-6.0)
2. ჩაპეკის შემჟავებული არე (ბაქტერიების დასათრგუნავად) – შემადგენლობა %: NaNO_3 -0,91, KH_2PO_4 -0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,05, KCl -0,05, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,002, გლუკოზა-2,0, აგარ-აგარი-2,0. (pH 3.5-4.0)
3. ჩაპეკ-დოქსის არე – შემადგენლობა %: საქაროზა-3,0, NaNO_3 -0,2, K_2HPO_4 -0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,05, KCl -0,05, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,001, აგარ-აგარი-2,0 (pH 4.5-5.0).
4. სელექტიური საკვები არე – შემადგენლობა %: NaNO_3 -0,3, KH_2PO_4 -0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,05, KCl -0,05, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,002, საფუვრის ექსტრაქტი-0,1, მიკროკრისტალური ცელულოზა-0,1, აგარ-აგარი-2,0 (pH 5.5-6.0).
5. ცელულოზის დამშლელი მიკროსკოპული სოკოების გამოსაყოფად გეტჩინსონისა და კლეიტონის საკვები არე – შემადგენლობა %: K_2HPO_4 -0,1, CaCl_2 -0,01, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,03, NaCl -0,01, FeCl_2 -0,001, NaNO_3 - 0,25, აგარ-აგარი-2,0 (pH 5,5-6,0).
6. ჩაპეკის მოდიფიცირებული არე - შემადგენლობა %: NaNO_3 -9.1, KH_2PO_4 -1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.5, KCl -0.5, FeSO_4 -0.02, სახამებელი-0,2, აგარ-აგარი-2,0 (pH 5.5-6.0).

სტერილიზაციის რეჟიმი იყი 0,7 ატმ, 40წთ. კულტივირებას ვაწარმოებდით 28⁰-30⁰C-ზე.

ნიადაგებიდან მიკოფლორის პირველადი გამოყოფის შემდეგ, პირველადი ჩანათესებიდან, გამოვყავით სუფთა კულტურები:

მათ მისაღებად პეტრის თასებზე განვითარებულ ცალკეულ კოლონიების ამოთესვას ვიწყებდით ინკუბაციის მე-5 დღეს აღნიშნულ საკვებ არეებზე. სუფთა კულტურების გამოყოფას ვაწარმოებდით მარყუჟის მოხრილი წვერით, რომლის საშუალებით ფრთხილად გადაგვქონდა მიცელიუმის ნაგლეჯი საკვებ არეზე, მჭიდრო სპორომატარებლობისას სპორების მინიმალური რაოდენობა თავსდებოდა საკვებ არეზე. გამოყოფილი სუფთა კულტურები გადაგვქონდა აგარიზებულ საკვებ

არეებიან სინჯარებში. კულტივირებას ვაწარმოებდით 28⁰-30⁰C-ზე 10 დღის განმავლობაში. უკვე გასუფთავებულ კულტურებს ვინახავდით მაცივარში 4⁰C-ზე.

გავრცელებული მიკროსკოპული სოკოების რაოდენობაზე ვმსჯელობდით კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულის განსაზღვრით (კწე) 1გრ. მშრალ ნიადაგზე გადაანგარიშებით, ფორმულა $A=abv/g$.[4]

ცალკეული გვარის შეხვედრის სიხშირეს ვსაზღვრავდით ფორმულით:

$$\text{გვარის შეხვედრის სიხშირე} = \frac{\text{ნიმუშების რაოდენობა, სადაც გამოვლენილია მოცემული გვარი}}{\text{ნიმუშების საერთო რაოდენობა}}$$

2.2 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაცია.

დასაწყისში (გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიცირებამდე) კულტურებს მინიჭებული ჰქონდა გამოყოფის ადგილმდებარეობის პირველი ასო (კახეთი-K; იმერეთი I და ა.შ.) და ციფრი, (დანომვრის მიხედვით).

თავდაპირველად კულტურალურ-მორფოლოგიურ თვისებებს ავლწერდით ვიზუალურად კოლონიების ზრდის სიჩქარის, კოლონიის დიამეტრის ზომის, ფერის და ა. შ. მიხედვით. შემდეგ ვაწარმოებდით, მიკროსკოპის მცირე გადიდებით კოლონიების პეტრის თასზე დათვალიერებას, შემდეგ კი ვამზადებდით პრეპარატებს საანალიზოდ:

მიკროსკოპული პრეპარატის დასამზადებლად, გასტერილებული მარყუჟის წვერით ვჭრიდით სოკოების კოლონიების ნაწილს, რამდენადაც შესაძლებელი იყო საკვები არის აგარის გარეშე, ვათავსებდით წყლის წვეთში, რომელშიც იხსნებოდა სპორები. ვინაიდან სოკოს ზოგიერთი ელემენტი, ძირითადად სპორები და კონიდიები არ სველდება წყლით, წყალს ვამატებდით ეთილის სპირტს 1:1 ან კონცენტრირებულ ძმარმჟავას.

ასევე გამოხადებით პრეპარატ-ანაბეჭდს, აგარიზებული საკვები არიდან ვჭრიდით დაახლოებით 10 მმ დიამეტრის კოლონიას, რომელსაც ვათავსებდით სასაგნე მინაზე კოლონიით ზევით, ფრთხილად და მჭიდროდ ზემოდან ვაფარებდით სტერილურ საფარ მინას. შემდეგ საფარ მინას ვდებდით სასაგნე მინაზე, რომელზეც წინასწარ დაწვეთებული გვექონდა წყალი ან მეთილენის ლურჯი. მზა პრეპარატის კვლევას ვახდენდით მშრალი ოპტიკური სისტემით.

იდენტიფიცირებისათვის გამოვიყენეთ საკვლევები. [72]

2.3 ცელულაზების და ქსილანაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით)

ცელულაზა/ქსილანაზას *producentebis* სკრინინგს ვაწარმოებდით სიღრმული კულტივირებით. ჩასათესი მასალა წარმოადგენდა 10 დღიანი კულტურის კონიდიების სუსპენზიას. მიკროსკოპული სოკოების ცალკეული შტამების სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა 250 მლ-იან ერლენმეიერის კონუსურ კოლბებში, თერმოსტატირებულ სანჯღრეველაზე (180-200ბრ/წთ). 38-50°C-ზე, 72-96 საათის განმავლობაში.

ცელულაზას პროდუცენტების გამოსავლენად სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა თხევად არეში, რომლის შემადგენლობაა%: მიკროკრისტალური ცელულოზა 1,0 NaNO_3 -0,3, KH_2PO_4 -0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,05, სიმინდის ექსტრაქტი-1,5. pH 4.5.

ფერმენტ ქსილანაზის სინთეზის უნარის მაქსიმალური გამოვლენის მიზნით შტამების კულტივირებას ვახდენდით შემდეგი შემადგენლობის საკვებ არეში (%): სოიას ფქვილი- 3,0; Na_2HPO_4 - 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,2; KCl-0,05; MgSO_4 - 0,015. კულტივირების ტემპერატურა მეზოფილური შტამებისათვის – 28-30 °C, pH 4,2-4,6; კულტივირების ხანგრძლივობა 68-72 სთ. , ხოლო თერმოფილური შტამების კულტივირებას ვახდენდით 98 სთ-ის განმავლობაში 40°C-ზე და ზევით, pH 4,2-4,6; კულტურებს ვზრდიდით სანჯღრეველაზე ერლენ მეიერის 250 მლ-იან კოლბებში.

კულტივირების შემდეგ კულტურალურ სითხეს ვფილტრავდით ან ვაცენტრიფუგებდით (4000 ბრ/წთ 10 წუთი), ბიომასის მოსაშორებლად. ფერმენტების

აქტივობას ვსაზღვრავდით კულტურალური სითხის ცენტრიფუგაში, რადგან წინასწარი ცდებით დადგენილ იქნა, რომ ფერმენტები კონცენტრირებულია ძირითადად სითხეში, ბიომასაში კი რჩება მხოლოდ 5-10%.

აღნიშნული კულტურების შესანახად ვიყენებდით უნივერსალურ არეს, შემდეგი შემადგენლობით: 1ლ-ზე: 0,5ლ ლუდის ბადაგი 7⁰B, 0,5ლ ონკანის წყალი, 20,0გ აგარ-აგარი. (pH 5.5-6.0).

2.4 საერთო ცელულაზური აქტივობის განსაზღვრა ფილტრის ქაღალდის მიხედვით

საერთო ცელულაზურ აქტივობას ვსაზღვრავდით ცნობილი მეთოდი, [76] რომელიც დაფუძნებულია ცელულაზას უნარზე, მოახდინოს უხსნადი სუბსტრატების (კერძოდ, ფილტრის ქაღალდის) ჰიდროლიზი ხსნად ოლიგო- და მონოსაქარიდებამდე. აღმდგენელ შაქრებს ვსაზღვრავდით სომოჯი-ნელსონის მეთოდით [131]

სარეაქციო არის შემადგენლობა: 50მგ ვატმანის №1 ფილტრის ქაღალდს, ვჭრიდით 1X6სმ ზომაზე, ვკეცავდით გარმონისებურად. შემდეგ ვათავსებდით სინჯარაში, და ვამატებდით 1მლ აცეტატურ ბუფერს (0.05 M, PH 4.6). სინჯარებს ვათავსებდით თერმოსტატში 60⁰C-ზე, 5წთ-ით, შემდეგ ვუმატებდით 1მლ კულტურალურ სითხეს (რომელიც წინასწარ განვაზავეთ გამოხდილი წყლით, 1/5-თან შეფარდებით). ინკუბაციას ვაწარმოებდით თერმოსტატში 1საათის განმავლობაში. ამის შემდეგ სინჯარებიდან ვიღებდით 1მლ საანალიზო ხსნარს და ვუმატებდით 1მლ სომოჯის რეაქტივს სხვა სინჯარაში და გადაგვექონდა მადულარ აბაზანაში, ვადუღებდით 20 წუთიანი (დუდილის დროს სინჯარებს თავზე მორგებული ჰქონდათ წვეთდამჭერები). 20 წუთი დუდილის შემდეგ სინჯარებს ვაცივებდით ცივ წყალში, რის შემდეგაც ვუმატებდით ნელსონის რეაქტივს 1მლ-ის ოდენობით, შემდეგ თითოეულ სინჯარას ვასხამდით 7-7მლ გამოხდილ წყალს.

კონტროლად გამოიყენებოდა: ფილტრის ქაღალდს დამატებული 2მლ ბუფერი pH 4.6 (ფერმენტული ხსნარის პირობებში).

ოპტიკურ სიმკვრივეს ვზომავდით 597 ნმ ტალღაზე.

საერთო ცელულაზურ აქტივობას ვანგარიშობდით შემდეგი ფორმულით:

$$A = \frac{a. შ.}{t \times E}$$

სადაც: - A – აქტივობაა ფილტრის ქაღალდის მიხედვით ერთ/გ ან ერთ/მლ;

ა. შ. – აღმდგენელი შაქრების რაოდენობა მკმ/ლ;

t – ინკუბაციის დრო წუთებში

E – ფერმენტის კონცენტრაცია საინკუბაციო ხსნარში გ/ლ ან მლ/ლ

2.5 ენდო-1,4-β-D-ქსილანაზური აქტივობის განსაზღვრა

ენდოქსილანაზური აქტივობის განსაზღვრისათვის სუბსტრატად ვიყენებდით 1% არყის ხის ქსილანს. აღნიშნული სუბსტრატის 1 გ ვხსნიდით 80 მლ 0,05 M Na-ციტრატულ ბუფერში (pH 5,3) ვაცხელებდით მაგნიტურ სარეველაზე დუდილის ტემპერატურამდე. ხსნარი ოთახის ტემპერატურაზე ჰომოგენიზირდებოდა მუდმივ მორევის პირობებში 24 საათის განმავლობაში, რის შემდეგ ბუფერით ვავსებდით 100 მლ-მდე. სუბსტრატს ვინახავდით +4°C-ზე, მაქსიმუმ ერთი კვირის განმავლობაში. სარეაქციო არე შედგება 1, 8 მლ სუბსტრატის ხსნარისა და 0,2 მლ ფერმენტული ხსნარისაგან. ინკუბაციის ხანგრძლივობა 5 წთ 50°C-ზე. აღმდგენელი შაქრების განსაზღვრისათვის სარეაქციო არეს ემატება 3 მლ DNS-ის რეაქტივი. რის შემდეგ დუღდება 5 წუთი და ცივდება ცივი წყლის აბაზანაში. ნიმუში იზომება სპექტოფოტომეტრზე 540 ნმ კონტროლის წინააღმდეგ. კონტროლი მზადდება ზუსტად ანალოგიურად, იმ განსხვავებით რომ ნაცვლად 0,2 მლ ფერმენტული ხსნარისა სარეაქციო არეში შეგვაქვს 0,2 მლ ბუფერული ხსნარი. სტანდარტული ხსნარი მზადდება სუფთა ქსილოზაზე. საწყისი ხსნარის მოლარობა 0,01-ის ტოლია (8).

2.6 კმც-აზური აქტივობის განსაზღვრა

საერთო ცელულაზური აქტივობის განსაზღვრისთვის ვიყენებდით კარბოქსიმეთილცელულოზის Na-ის მარილის (ჩანაცვლების ხარისხი 0,5; პოლიმერიზაციის ხარისხი 500-550 «Sigma») 1,5%-ხსნარს აცეტატურ ბუფერში (0.05M, pH 4.5). ანალიზის მსვლელობა: 2 მლ სუბსტრატს ემატება 1 მლ ფერმენტის კულტურალუტი სითხე, ან ფერმენტული პრეპარატის ხსნარი, ინკუბაცია მიმდინარეობდა 55°C 30 წთ. ინკუბაციის შემდეგ სარეაქციო არიდან ვიღებდით 1 მლ-ს, ვუმატებდით 1 მლ სომოჯის რეაქტივს და ვადულებდით წყლის აბაზანაზე, 20 წთ-ით. შემდეგ ხსნარს ვაცივებდით და ვუმატებდით ნელსონის რეაქტივის 1 მლ-ს, სინჯარას ვანჯღრევდით და საანალიზო ხსნარს ვავსებდით 10 მლ-მდე დისტილირებული წყლით. შეფერვის ინტენსივობას ვსაზღვრავდით 597 ნმ სიგრძის ტალღაზე. გლუკოზის ექვივალენტებში აღმდგენელი ჯგუფების რაოდენობას ვსაზღვრავდით გლუკოზის სტანდარტული ხსნარის მიხედვით აგებული საკალიბრო მრუდით. აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ის რაოდენობა, რომელიც აკატალიზებს მოცემულ პირობებში გლუკოზის ერთი მიკრომოლის წარმოქმნას ერთ წუთში.

2.7 β-გლუკოზიდასას აქტივობა

ცელობიაზური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი დაფუძნებულია ფერმენტის უნარზე, ცელობიოზაზე მოქმედებისას წარმოქმნას გლუკოზას გარკვეული რაოდენობა. სუბსტრატად ვიყენებდით D-ცელობიოზას (“SIGMA”). გლუკოზას ვსაზღვრავდით გლუკოზოქსიდაზურ-პეროქსიდაზული მეთოდით გლუკოზის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით ფერმენტებს: პეროქსიდაზა, აქტივობით 350-400 ათასი ერთ/გ (“SIGMA”), გლუკოზოქსიდაზა აქტივობით 146 ათასი ერთ/გ (“SIGMA”). სარეაქციო არეში შეგვქონდა 0,2 მლ 40mM კონცენტრაციის ცელობიოზა (ცელობიოზა გახსნილი 0,05M აცეტატურ ბუფერში pH 4,5), ვამატებდით 1,7 მლ აცეტატურ ბუფერს და ვათავსებდით თერმოსტატში 3-4 წთ 55°C შემდეგ ვამატებდით 0,1 მლ ფერმენტულ ხსნარს იმ გაანგარიშებით, რომ ხსნარის საერთო მოცულობა ყოფილიყო 2 მლ. ვაყოვნებდით ოთახის ტემპერატურაზე 10 წთ.

გლუკოზის რაოდენობას ვსაზღვრავდით გლუკოზოოქსიდაზური-პეროქსიდაზული მეთოდით. 410 ნმ ტალღის სიგრძეზე. გლუკოზის რაოდენობას ვანგარიშობდით საკალიბრო მრუდის მიხედვით, რომელიც აგებული იყო გლუკოზის სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარების მიმართ. აქტივობის ერთეულად ვიღებდით ფერმენტის იმ რაოდენობას, რომელიც აჰიდროლიზებს 1 მოლ ცელობიოზას ან წარმოქმნის 2მ გლუკოზას 1 წუთში მოცემულ პირობებში.

2.8 კულტურების პათოგენურობის დადგენა

მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ზოოპათოგენურობის განსაზღვრას ვახდენდით კურდღლის ვენაში სოკოს სუსპენზიის შეყვანით [150]

ფიზიოლოგიურ ხსნარით ვამზადებდით სოკოს კულტურის სუსპენზიას ისე, რომ განზავების მიხედვით მიგვეღო ორი დოზა: 250 და 500 ათასი უჯრედი 1მლ-ში. ასეთი ფიზიოლოგიური ხსნარი შეგვყავდა კურდღლის ვენაში და ცხოველის რეაქციას ვსწავლობდით კლინიკური დაკვირვებით, პათანატომიური გაკვეთების, ორგანოების მიკროსკოპული და მიკოლოგიური შესწავლის გზით.

პათანატომიური გაკვეთების მიღებული თხელი ანათლების მიკროსკოპული გამოკვლევების დროს ძირითად ყურადღებას ვაქცევდით სოკოს განვითარებას ორგანოებში. მიკოლოგიური ანალიზისათვის სპირტქურის ალზე გატარებული ღვიძლიდან და თირკმლიდან ვიღებდით ანათლებს ვათავსებდით აგარის ზედაპირზე ჩაპეკის არიან პეტრის თასებში.

კულტივირებას ვახდენდით 40⁰C-ზე 10 დღის განმავლობაში. ფიტოპათოგენურობის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით ბერესტეცკის მეთოდს [2]: ხორბლის მარცვლებს ვასველებდით სოკოს კულტურის კულტურალური ხსნარით. პათოლოგიურად ითვლებოდა ის კულტურები, რომლებიც იწვევდნენ მარცვლების ზრდის შეფერხებას 30%-ით ან მეტით.

2.9 ტოქსიურობის განსაზღვრა კურდღელზე კანის სინჯის მიხედვით

კურდღელს წინასწარ გაპარსულ კანზე, ბარძაყის მიდამოში ვაზელდით მცენარეულ ზეთში დაქუცმაცებულ და დასრესილი სოკოს 10 დღიან მიცელიუმს, ასევე ხორბლის მარცვალზე გაზრდილ 15 დღიანი კულტურების ექსტრაქტს.

სოკოების კულტივირებისათვის, ხორბლის მარცვალი შეგვქონდა 1,5ლ მოცულობის ბრტყელკედლებიან ჭურჭელში 100–200გ ოდენობით. ვნამავდით წყლით და ვასტერილებდით 1ატმ-ზე 40წუთის განმავლობაში. სოკოს კულტურებიან სინჯარებში ვამატებდით 3-5მლ სტერილურ წყალს, ჩამოვრეცხავდით კონდიებს და სპირტქურის ალზე გადაგვქონდა ჭურჭელში, სადაც მოთავსებული იყო გასტერილებული ხორბლის მარცვლები. ნათესს ვათავსებდით თერმოსტატში და ვზრდიდით 40°C-ზე 15 დღის განმავლობაში. შემდეგ 4-5 დღე ვაჩერებდით ოთახის ტემპერატურაზე. ტოქსიკური ნივთიერებების უკეთესად დაგროვებისათვის, ყოველ ორ დღეში ერთხელ ვურევდით. სოკოს კარგად განვითარების შემთხვევაში, ხორბლის მარცვლებს ვიღებდით ჭურჭლიდან, ვათავსებდით ფილტრის ქაღალდისაგან დამზადებულ პარკებში და ვაშრობდით 40°C-ზე. შემდეგ 50გ-ს ვფქვავდით და ვუმატებდით გოგირდის ეთერს. ექსტრაქცია გრძელდებოდა 24სთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. ექსტრაქტს ვფილტრავდით და ვაორთქლებდით ამწოვ კარადაში გამხსნელის სრულ აორთქლებამდე. მიღებულ ცხიმისებურ მასას ორჯერ, 24სთ-ის ინტერვალით ვუსმევდით კურდღელს წინასწარ დამუშავებული კანის ზედაპირზე (4-5სმ²). კანის რეაქციას ვსწავლობდით სპესივცევას მიერ შემოთავაზებული მეთოდით [16]

2.10 ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა

გამოყოფილი კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენის მიზნით შევისწავლეთ ტემპერატურის, pH-ისა და NaCl-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა კულტურების ზრდა-განვითარებაზე.

ტემპერატურულ საზღვრებს ვადგენდით მიკროსკოპული სოკოების გაზრდით 5-55⁰ C-მდე, 5⁰C-ის ინტერვალით.

კულტურების ზრდის ოპტიმალური pH-ის დასადგენად კულტურებს ვზრდიდით pH 2.0-დან pH 10.0-მდე 0,5 ინტერვალით, საწყის საკვებ არეში.

ტემპერატურისა და pH-ის ოპტიმუმად მიღებული იყო სოკოების კულტურების მაქსიმალური ნაზარდი, რომელიც ისაზღვრებოდა კოლონიის დიამეტრის ზომით და ზრდის სიჩქარით.

ჰალოფილური კულტურების გამოსავლენად საწყის საკვებ არეში NaCl შეტანილი იყო სხვადასხვა კონცენტრაციით 0,5M დან – 4,0M-მდე (შესაბამისად 2,93% – 23,2%).

2.11 ცელულაზების და ქსილანაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება

ფერმენტული პრეპარატების მისაღებად კულტურალური სითხის ფილტრატს ვაცივებდით, ან ვაორთქლებდით ვაკუუმ ამაორთქლებელში ისე რომ 3 ჯერ შემცირებულიყო მისი მოცულობა, შემდეგ ვფილტრავდით მინის ფილტრში და შემდეგ ისევ ვაცივებდით 4⁰C-მდე. გაცივებულ ფერმენტულ ხსნარს, (+4⁰C) თანდათანობით მორევის პირობებში ვუმატებდით ეთილის სპირტს. ნარევს ვტოვებდით 15-20 წთ-ის განმავლობაში, წარმოქმნილ ნალექს ვაშორებდით ცენტრიფუგირებით (4000 ბრ/წთ 10 წთ-ის განმავლობაში) და შემდეგ ვაშრობდით ვაკუუმ ექსიკატორში ან ლიოფილურად. მიღებულ ფერმენტულ პრეპარატს ვინახავდით ექსიკატორში +4⁰C პირობებში.

2.12 ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმების დადგენა

ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმების დასადგენად ფერმენტულ აქტივობას ვზომავდით 20⁰-დან - 80⁰C-მდე, 5⁰C ტემპერატურულ ინტერვალში. ქსილანაზას და ცელულაზას მოქმედების ოპტიმუმების დადგენისას ფერმენტული პრეპარატები იხსნებოდა 0,05M აცეტატურ

ბუფერში, pH 4.7. სუბსტრატად ცელულაზებისათვის ვიყენებდით ფილტრის ქაღალდს, ქსილანაზისათვის - ქსილანს ფერმენტის მოქმედების ოპტიმალურ ბუფერულ სისტემაში.

ფერმენტების მოქმედების pH ოპტიუმების დასადგენად საინკუბაციო არის pH-ს ვცვლიდით pH 2.0-დან – pH 10.0-მდე, 0,5 ის ინტერვალით. აქტივობები ისაზღვრებოდა სტანდარტული მეთოდით და გამოისახებოდა პროცენტებში.

2.13 SDS გელ – ელექტროფორეზი

საკვლევი ცილის ჰომოგენურობისა და მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით ფირფიტოვან გელ-ელექტროფორეზს.

ვატარებდით SDS გელ-ელექტროფორეზს 8%-იან პოლიაკრილამიდის გელში. ბრომფენოლის ლურჯის მოძრაობის მიხედვით, რომელიც დამატებული ჰქონდა ნიმუშსა და მოწმეებს, თვალს ვადევნებდით ელექტროფორეზის მსვლელობას. ვაგებდით მოწმეების მოლეკულური მასების დამოკიდებულების გრაფიკს მათ გადაადგილებაზე, საიდანაც ვსაზღვრავდით ცილის მოლეკულურ მასას. მოწმეებად ვიყენებდით ცნობილი მოლეკულური მასის ცილების ნაკრებს:

1. ალბუმინი-68000;
2. პეროქსიდაზა-44000;
3. ლიზოციმი -14000.

2.14 იზოელექტროფოკუსირება

ფერმენტის იზოელექტრული წერტილისა და მისი ჰომოგენურობის დასადგენად, ნიმუშებს ვსაზღვრავდით ანალიზური იზოელექტროფოკუსირებით შერეული აგაროზა-აკრილამიდის გელის ფირფიტაზე ამფოლინების გრადიენტით [172].

იზოელექტრული წერტილი დავადგინეთ ზიმოგრამული აქტივობისა და pH-ის გაზომვების მიხედვით.

2.15 ცელულოზა შემცველი სუბსტრატების ფერმენტული ჰიდროლიზი

ცელულოზური სუბსტრატების ფერმენტულ ჰიდროლიზს ვაწარმოებდით ნიმუშის შესაბამისი მომზადების შემდეგ რაც მდგომარეობდა ნიმუშის გაშრობაში და მშრალი ბიომასის შესაბამისად დაქუცმაცებაში 3-4 მიკრონამდე. დაქუცმაცებულ და გამშრალ ნიმუშს ვათავსებდით გამოხდილ წყალში ან 0,05M ბუფერში, რომელიც შეესაბამებოდა ფერმენტის მოქმედების ოპტიმუმს. ერთ გრამს ემატებოდა 5-7 მილილიტრი შესაბამისი ფერმენტული სისტემის (ცელულაზები ან ქსილანაზები) შემცველი ხსნარი. მიღებული ნარევი ინკუბირდებოდა 50-65°C ტემპერატურული რეჟიმის პირობებში 2, 4, 8 ან 24 საათის განმავლობაში, რის შედეგადაც იზომებოდა აღმდგენელი შაქრების და გლუკოზის რაოდენობა. მიღებული შედეგით ვმსჯელობდით სუბსტრატის ჰიდროლიზის ხარისხზე.

2.16 აღმდგენელი შაქრების განსაზღვრა

შაქრების რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის გამოიყენებოდა სპექტრალური მეთოდი DNS რეაქტივის გამოყენებით.

DNS რეაქტივი მზადდებოდა შემდეგნაირად: 5.3გ DNS რეაქტივს ემატებოდა 9.9გ ნატრიუმის ტუტე, 200გ სეგნეტის მარილი, 3.8 მლ ფენოლი, 4.15გ ნატრიუმის მეტაბისულფიტი და იხსნებოდა 708 მლ გამოხდილ წყალში.

აღმდგენელი შაქრების განსაზღვრის მიზნით ნიმუშის 1-2 მლ თავსდებოდა სინჯარაში, ემატებოდა 3 მლ DNS რეაქტივი და თავსდებოდა მდულარე წყლის აბაზანაზე 5 წთ განმავლობაში, ფერის ინტენსივობა იზომებოდა 540 ნმ ტალღის სიგრძეზე კონტროლის მიმართ.

შედეგების გადაანგარიშება ხდებოდა საკალიბრო მრუდის მიხედვით, რომელიც აგებული იყო გლუკოზის წინასწარ ცნობილი კონცენტრაციების (მგ/მლ) მიმართ.

2.17 გლუკოზის განსაზღვრა

გლუკოზის რაოდენობას ვსაზღვრავდით გლუკოზოოქსიდაზურ-პეროქსიდაზული მეთოდით. 0,2 მლ საანალიზო ხსნარს ემატებოდა გლუკოზოოქსიდაზა-პეროქსიდაზას რეაქტივი 3 მლ რაოდენობით. 40 წთ-იანი დაყოვნების შემდეგ წარმოქმნილი ფერის ინტენსივობა იზომებოდა სპექტოფოტომეტრზე 410 ნმ ტალღის სიგრძეზე. საანალიზო ხსნარში გლუკოზის რაოდენობას ვანგარიშობდით წინასწარ აგებული საკალიბრო მრუდის მიხედვით.

2.18 ექსპერიმენტული მონაცემების დამუშავების ელემენტარული მათემატიკური ფორმულა

ექსპერიმენტული მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება ხდებოდა როკიცკის მეთოდის მიხედვით. განმეორებადი ცდების საშუალო არითმეტიკულს ვითვლიდით ფორმულით:

$$X = \frac{\sum X_i}{n}$$

სადაც X - საშუალო არითმეტიკულია,

X_i - ვარიანტი,

N - ვარიანტების რიცხვი.

საშუალო არითმეტიკულის საშუალო კვადრატულ ცდომილებს ვითვლიდით შემდეგი ფორმულით:

$$S_x = \frac{\sum (X_i - X)^2}{n(n-1)}$$

სადაც S_x – საშუალო არითმეტიკულის საშუალო კვადრატული ცდომილებაა.

სამუშაოში მოყვანილი მონაცემები 5-8 ცდის საშუალო არითმეტიკულია ($n=5$ -დან 8-მდე).

თავი III

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა:

ცელულაზა-ქსილანაზას პროდუცენტი თერმოფილური სოკოების შტამების სელექცია და მათი ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური დახასიათება

3.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა

გამომდინარე იქიდან, რომ საქართველოს ნიადაგობრივ კლიმატური ზონები ექსტრემოფილი მიკროორგანიზმის არსებობაზე თანმიმდევრულად არასდროს შეფასებულა, მიზანშეწონილად ჩავთვალეთ, და ცელულაზა/ქსილანაზის მეწარმე შტამების სელექციის გარდა ზოგიერთი საერთო ხასიათის კვლევებიც ჩავატარებინა.

კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურების რაოდენობრივმა ანალიზმა, გვიჩვენა რომ სხვა რეგიონებთან შედარებით,, მშრალი სუბტროპიკული კლიმატური და სტეპების ზონის მიკოფლორა გაცილებით მრავალრიცხოვანია და ამასთანავე მრავალფეროვანი. მრავალრიცხოვანია ასევე კონტინენტალური კლიმატური ზონა, მაგრამ შედარებით ერთფეროვანი. ალპური და სუბალპური ზონების მიკოფლორა მრავალფეროვანია, მაგრამ მცირერიცხოვანი. ტენიანი სუბტროპიკული კლიმატური ზონის მიკოფლორა ერთფეროვანი და მცირერიცხოვანია. ნახევრად უდაბნოს ზონის მიკოფლორაც მწირია.

კულტურების გამოყოფის დროს აუცილებელია იმის გათვალისწინება, რა მიზანია მკვლევარის წინაშე, რა სახის ექსტრემოფილია გამოსაყოფი და შესასწავლი, თუ საჭიროა ფერმენტი, რომელიც ოპტიმალურად ფუნქციონირებს ზომიერად მაღალი pH-ის და მარილის მაღალი კონცენტრაციის პირობებში, თუ დაბალ ან მაღალ ტემპერატურულ რეჟიმში. შესაბამისად, შერჩეული იქნა ისეთი ეკოლოგიური ნიშები, საიდანაც წინასწარ არსებული ინფორმაციით შესაძლებელი იქნებოდა

ასეთი მიკროორგანიზმების გამოყოფა. ეკოლოგიური ფაქტორების გათვალისწინებით შესაძლებელია მრავალფეროვანი მიკროორგანიზმების დიდი რაოდენობით გამოყოფა. ამავე დროს, აუცილებელია სწორედ შეირჩეს საკვები არე, რომელიც მიმართული ექნება უპირატესად რომელიმე კონკრეტული გვარის ან ცალკეული შტამის გამოსაყოფად [132]

გასათვალისწინებელია ინკუბაციის პირობები (ტემპერატურა, pH, ტენიანობა და სხვა), რის შესაბამისადაც უნდა დამუშავდეს გამოყოფილი ნიმუშები. ყველაფერი ეს განაპირობებს გამოყოფილი მიკროორგანიზმების ტიპს და რაოდენობას [103]

ბიომრავალფეროვნების შემცირების შესაჩერებლად აუცილებელია სახეობათა რაოდენობისა და შემადგენლობის კვლევა, რადგანაც ბიომრავალფეროვნების არსებობის ძირითად ობიექტად მიიჩნევა სახეობა. თითოეული სახეობა, როგორც ბუნებრივი ეკოსისტემის კომპონენტი, თავისი მრავალფეროვანი ბუნებრივი პოპულაციებით განაპირობებს ბიომრავალფეროვნების შენარჩუნებას [169]

ნიადაგიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები იზრდებოდა თერმოსტატში 30°C-ზე. პეტრის თასებზე ჩათესილი ნიადაგის ნიმუშების დათვალიერება და აღწერა ხდებოდა მე-3, მე-5, მე-7 და მე-10 დღეს. პირდაპირი განზავების მეთოდით ნიადაგების ნიმუშების დათესვისას ოპტიმალური აღმოჩნდა 1/10² და 1/10³ განზავებები.

უხვი და შედარებით მრავალფეროვანი მიკოფლორით გამოირჩეოდა უნივერსალური აგარიზებული საკვები არე, სადაც ჩვენს მიერ გამოყოფილი ყველა მიკროსკოპული სოკო იზრდებოდა. სწორედ ამის გამო, შემდგომ კვლევებში მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ აღნიშნული საკვები არის გამოყენება.

ნიადაგებიდან მიკოფლორის პირველადი გამოყოფის შემდეგ, პირველადი ჩანათესებიდან, გამოვყავით სუფთა კულტურები. მათ მისაღებად პეტრის თასებზე განვითარებულ ცალკეულ კოლონიების ამოთესვას ვიწყებდით ინკუბაციის მე-5 დღეს უნივერსალურ საკვებ არეზე. უკვე გამოყოფილ და სხვა მიკროორგანიზმებისაგან გასუფთავებულ კულტურებს ვინახავდით მაცივარში 4°C-ზე.

ჩვენს მიერ საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილია მიკროსკოპული სოკოს 212 კულტურა. გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიცირებამდე, კულტურებს მინიჭებული ჰქონდა გამოყოფის ადგილმდებარეობის პირველი ასო (კახეთი -K; იმერეთი -I, აჭარა-Aj და ა.შ.) და ციფრი, (დანომვრის მიხედვით).

3.2 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება

გამოყოფილი შტამების იდენტიფიცირებას ვაწარმოებდით კულტურალურ-მორფოლოგიურ თვისებებზე დაყრდნობითა და მიღებული შტამების ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური თვისებების დადგენით.

თავდაპირველად დავადგინეთ მსხვილი ტაქსონომიური ერთეული (კლასი, რიგი). ეს ერთეული განისაზღვრება რეპროდუქციული ორგანოებისა და აღნაგობის თავისებურებებით, არქსკონისა [26] და კრეიზელის [114] კლასიფიკაციაზე დაყრდნობით.

გამოყოფილი სუფთა კულტურების იდენტიფიცირებისათვის გამოვიყენეთ საკვლევები [15, 3, 11, 134, 72]

გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები მივაკუთვნეთ - Zygomycetes, Ascomycetes და Deiteromycetes კლასებს.

Zygomycetes კლასს მივაკუთვნეთ მიკროსკოპული სოკოების ის კულტურები, რომლებიც სქესობრივი გზით წარმოქმნიან – ზიგოტას, უსქესო გზით – სპორანგიებს ან სპორანგიოლებს უმოძრაო სპორებით. მართალია, ზოგიერთ ზიგომიცეტს უვითარდება კონიდიები, მაგრამ ამ შემთხვევაში ხდებოდა დადგენა, რომ ზიგოტა ნამდვილად წარმოიქმნება.

Ascomycetes კლასს მივაკუთვნეთ მიკროსკოპული სოკოების ის კულტურები, რომლებიც განვითარების ციკლში წარმოქმნიან ნებისმიერი ფორმისა და სიდიდის ჩანთებს. უფრო ხშირად ეს ჩანთები შეიცავენ 8 ასკოსპორას. რამდენადმე განსხვავებულია ამ კლასში შემავალი გვარების - *Penicillium*-ისა და *Aspergillus*-ის გვარის წარმომადგენლების გამრავლება: უსქესო გამრავლება - კონიდიებით,

სქესობრივი გამრავლება - ჩანთებით. მხოლოდ ზოგიერთ წარმომადგენელს არ აღენიშნებოდა ჩანთების წარმოქმნა, ან თუ წარმოქმნიდნენ კლეისტოტეციების ტიპის ჩაკეტილ ნაყოფსხეულებში. ამ გვარის სახეობების იდენტიფიცირებისათვის დიდი მნიშვნელობა ენიჭებოდა კულტურალური თვისებების დადგენას, კერძოდ, კოლონიის ზრდის სიჩქარეს, ფერს და სიდიდეს, კიდეების და ცენტრის აღნაგობას, ზედაპირის ხასიათს, (ხავერდოვანი, ფუმფულა, ხაოიანი, ბეწვისებრი). რეპროდუქციული ორგანოების თავისებურებას, კონიდიამტარებლობას, კონიდიების განლაგებას. კოლონიის ჰაეროვანი ნაწილს (ვეგეტატიური მიცელიუმი, კონიდიალური თავები).

Deiteromycetes კლასს მივაკუთვნეთ ის კულტურები, რომელთაც ახასიათებდათ მრავალფეროვანი კონიდიალური სპორათა შერწყმა და განვითარების ციკლში არ აღენიშნებოდათ სქესობრივი სტადია.

კულტურების კულტურალურ-მორფოლოგიური თვისებების დასახასიათებლად, ვახდენდით კულტურების დათვალიერებას პეტრის თასზე, მიკროსკოპის მცირე გადიდებით, შემდეგ კი ვამზადებდით პრეპარატებს აღნიშნული მეთოდებით.

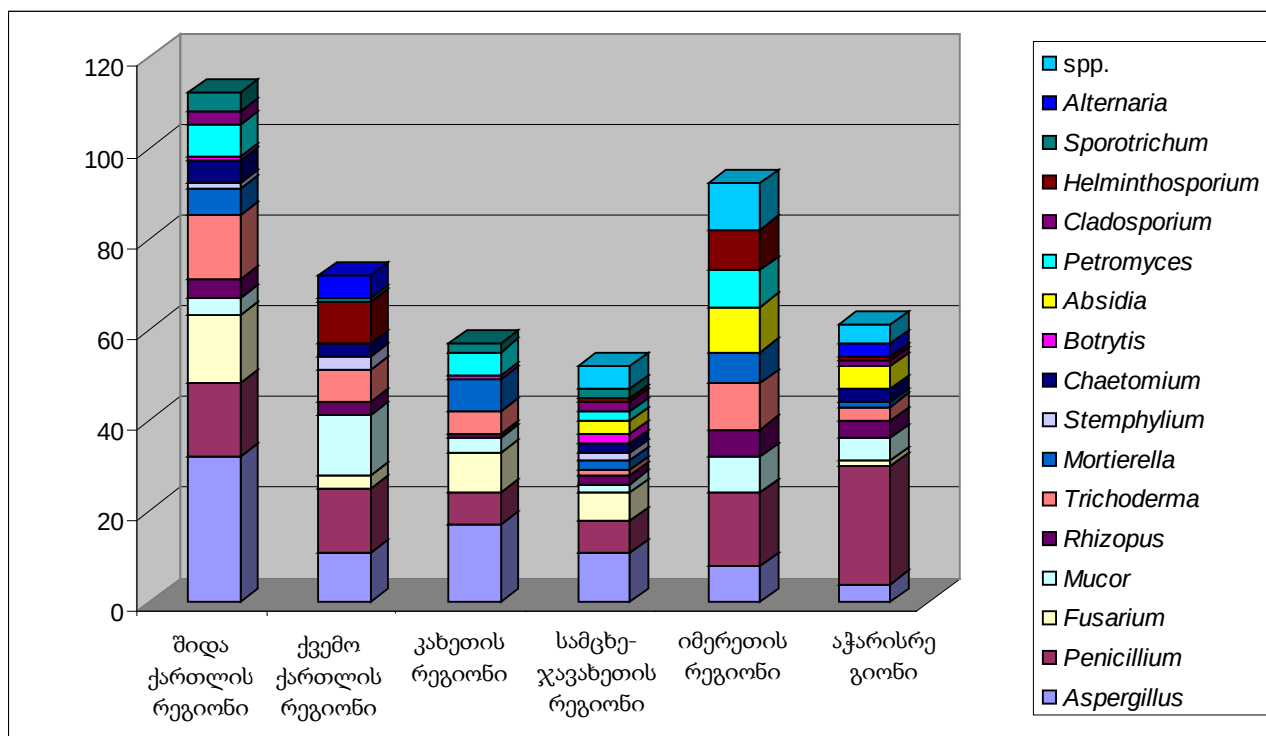
პირველ შემთხვევაში დგინდებოდა შერწყმული სპორების (სპორაშერწყმულობა) მიერთების ხასიათი (ტიპი) საჰაერო ან სუბსტრატულ მიცელიუმთან, სპორანგიმატარებლობისა და კონიდიამტარებლობის დატოტვა, სპორებისა და კონიდიების (ერთეული, ჯგუფური) მიერთების უნარი და ა.შ. მოკლედ, ყველა ის თვისება, რომელთა დადგენა არ ხდება პრეპარატის საშუალებით.

საქართველოში სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებში დადგენილია დომინანტური გვარები. კვლევების შედეგად მიღებული მონაცემები დაემთხვა ლიტერატურულ მონაცემებს, კერძოდ, მიკროსკოპულ სოკოებს შორის *Aspergillus*, *Penicillium*-ის გვარები ყველაზე ფართოდ გაავრცელებული. შემდეგ მოდის *Fusarium*-ის და *Trichoderma*-ს გვარები. დანარჩენი გვარები შედარებით მცირე რაოდენობითაა წარმოდგენილი. აღსანიშნავია რომ, გავრცელებით პირველ და მეორე ადგილზე მყოფი გვარები ყველა ნიადაგობრივ-კლიმატურ ზონაში გვხვდება, დადგენილია მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა

გვარების გავრცელების კანონზომიერება, რაც განპირობებულია გარემოს ეკოლოგიური და გეოგრაფიული ფაქტორებით, და თავად სოკოების ფიზიოლოგიური თავისებურებებით. ეს ჩვენს მიერ ექსპერიმენტალური მონაცემები შეჯამებულია ქვემოთ მოყვანილ სურათზე (სურათი 1).

მიუხედავად იმისა, რომ საქართველოს ყველა რეგიონი გამორჩეულად მდიდარია მიკროსკოპული სოკოების ცალკეული გვარებით და მათი წარმომადგენლებით, მაინც უნდა აღინიშნოს, რომ მრავალფეროვნებით ერთ-ერთი პირველია სამცხე-ჯავხეთი, მაშინ როცა მიკროსკოპული სოკოების საერთო რაოდენობით გამოირჩევიან შიდა ქართლი და იმერეთი.

ანალოგიური კვლევები საქართველოს მასშტაბით არ ჩატარებულა, სურათზე 1-ზე მითითებული ყველა გვარები და მათი ცალკეული წარმომადგენლები აქტიურ მონაწილეობას იღებენ ნიადაგის განაყოფიერებასა და მოსავლიანობის გაზრდაში, რაც შესაბამისად გამოიხატება ფერმენტების და სხვა მეტაბოლიტების გამოყოფაში, რაც მათ ჩვეულებრივად ახასიათებთ. დურმიშიძის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში შესწავლილია ბაქტერიებისა და აქტინობაქტერიების გავრცელება ქვეყნის მასშტაბით, საიდანაც ჩანს, რომ საქართველოს ნიადაგი ასევე მდიდარია ამ ორი ტაქსონომიური ჯგუფის წარმომადგენლებითაც. ცახადია, რომ მცენარეულ ექსუდატებთან ერთად სოკოური, ბაქტერიული და აქტინობაქტერიების მეტაბოლიტები უზრუნველყოფენ იმ ნაერთების აკუმულირებას ნიადაგში (ორგანული და ამინომჟავები, სხვადასხვა ნახშირწყლები, სხვა დაბალმოლეკულური მეტაბოლიტები), რომლებიც მნიშვნელოვანია აგრარული კულტურების და მათ შორის მარცვლოვანების უხვი მოსავლის მისაღებად. განსაკუთრებით ნაკლებ ნალექიან ადმოსავლეთ საქართველოსათვის, ცალკე პრობლემად რჩება აგრარული პლანტაციების რეგულარული მორწყვის საკითხები.



სურათი 1. საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივ ზონებში გამოვლენილი მიკროსკოპული სოკოების შეხვედრის სიხშირე გვარების მიხედვით

3.3 ცელულაზების და ქსილანაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით)

ცელულაზების და ქსილანაზების პროდუცენტების შერჩევის მიზნით, კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს შორის, ვაწარმოეთ სკრინინგი სიღრმული კულტივირების პირობებში.

ნახშირბადის წყაროდ აღებული იყო ისეთი სუბსტრატები, რომლებიც სამიეხელი ფერმენტების ინდუცირებადი უნარით ხასიათდება. მაგალითად, ცელულაზების პროდუცენტების შესარჩევად, ნახშირბადის წყაროდ, ვიყენებდით მიკროკრისტალურ ცელულოზას. ხოლო ქსილანაზების პროდუცენტების შესარჩევად

– ქსილანს. საბოლოოდ გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა გვარებიდან შერჩეულია ცელულაზა/ქსილანაზას 39 და ქსილანაზას 9 პროდუცენტი, რომლებიც კვალის სახითაც კი არ წარმოქმნიან ცელულაზას.

თავდაპირველად შტამების ზრდა-განვითარება წარმოებდა შემდეგი შემადგენლობის მყარ აგარიზირებულ, ლუდის ბადაგიან არეზე (1ლ-ზე ანგარიშით): 0,5 ლ ლუდის ბადაგი 7⁰ B, 0,5ლ ონკანის წყალი, 20,0გ აგარ-აგარი. (pH-5,5-6,0) გაზრდილი 10-დღიანი კულტურის კონიდიების სუსპენზია გამოყენებული იყო ჩასათეს მასალად.

სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა 250 მლ-იან ერლენმეიერის კონუსურ კოლბებში, თერმოსტატირებულ სანჯღრეველაზე (180-220 ბრ/წთ), 30-45°C-ზე, ცელულაზას პროდუცენტების გამოვლენის მიზნით კულტივირება მიმდინარეობდა 90-96 საათის განმავლობაში, ქსილანაზას პროდუცენტების - 68-76 სთ-ის. საკვები არის რაოდენობა შეადგენდა 50მლ-ს.

ქართლის რეგიონიდან გამოყოფილ კულტურებს შორის გამოვლენილი იქნა 11 ცელულაზა/ქსილანაზას და ქსილანაზას 2 პროდუცენტი (ცხრილი 1), კახეთი და სამცხე-ჯავახეთის რეგიონიდან 9 ცელულაზა/ქსილანაზას და ქსილანაზას 5 პროდუცენტი (ცხრილი 2). ხოლო აჭარა და იმერეთის რეგიონიდან 10 ცელულაზა/ქსილანაზას და ქსილანაზას 2 პროდუცენტი (ცხრილი 3).

ცხრილი 1. ქართლის რეგიონიდან გამოყოფილი ცელულაზა/ ქსილანაზას პროდუცენტები

#	კულტურა	ფილტრის ქაღალდი, ერთ/მლ	ქსილანაზა, ერთ/მლ
1	<i>Aspergillus terreus</i> K 61	0.92	7.5
2	<i>Aspergillus niger</i> K 11	-	11.0
3	<i>Aspergillus niger</i> N 25	0.83	6.0
4	<i>Aspergillus wentii</i> Ts 11	0.62	20.0
5	<i>Penicillium</i> sp.M 44	0.45	3,8

6	<i>Aspergillus</i> sp.Ts 12	0.85	8.0
7	<i>Penicillium</i> sp.Tn 23	0.50	2.0
8	<i>Penicillium</i> sp Tn 12	-	4.0
9	<i>Trichoderma viride</i> N 23	0.90	trace
10	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 33	0.64	7.5
11	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 44	0.50	3.0
12	<i>Trichoderma viride</i> N 52	0.86	5.2
13	<i>Sporotrichum pulverulentum</i> M 29	0.56	7.4

ცხრილი 2. კახეთის (Z) და სამცხე-ჯავახეთის (Sj) რეგიონიდან გამოყოფილი ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტები

	კულტურა	ფილტრის ქაღალდი, ერთ/მლ	ქსილანაზა, ერთ/მლ
1	<i>Aspergillus niger</i> Sj-4-2	-	11.2
2	<i>Aspergillus niger</i> Sj 46	-	19.6
3	<i>Aspergillus niger</i> Sj 35	-	15.4
4	<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	0.88	3,8
5	<i>Aspergillus wentii</i> Z 6-3	0.45	6,0
6	<i>Aspergillus</i> sp. Z 1-7	0.88	12.0
7	<i>Aspergillus</i> sp.Z 9-2	0.48	3.0
8	<i>Aspergillus</i> sp Sj 3-1	0.40	85.0
9	<i>Penicillium canescence</i> Sj 4-1	-	12.0
10	<i>Mucor plumbeus</i> Sj 1	-	6.0
11	<i>Penicillium</i> sp.Sj (β)2	0.64	3.2
12	<i>Penicillium</i> sp.Sj-51	0.40	2.0
13	<i>Penicillium</i> sp. Z 5-3	0.86	2.4
14	<i>Sporothrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	0.66	15.4

ცხრილი 3. იმერეთის (I) და აჭარის (Aj) რეგიონიდან გამოყოფილი ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტები

#	კულტურა	ფილტრის ქაღალდი, ერთ/მლ	ქსილანაზა, ერთ/მლ
1	<i>Aspergillus niger</i> I 8-1	0.2	5.5
2	<i>Aspergillus niger</i> I 2-4	-	2.2
3	<i>Aspergillus niger</i> Aj 8-3	-	4.1
4	<i>Aspergillus terreus</i> I 4-9	0.52	5.0
5	<i>Penicillium</i> sp. Aj 14	0.60	5.25
6	<i>Penicillium</i> sp. Aj 13	1.1	9.5
7	<i>Penicillium</i> sp. Aj 21	0.42	2.1
8	<i>Penicillium</i> sp. Aj-2	0.45	3.2
9	<i>Chaetomium thermophile</i> Aj 36	0.29	3.5
10	<i>Trichoderma viride</i> I 5-4	0.64	10.0
11	<i>Trichoderma viride</i> I 6-3	0.8	8.3
12	<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	1.05	6.0

აღსანიშნავია, რომ, კულტურების გამოყოფის დროს, შერჩეული საკვები არეები, განსხვავებული ნახშირბადის წყაროებით, საშუალებას გვაძლევდა, გვემსჯელა რომელი ფერმენტის უპირატესი სინთეზით უნდა ხასიათდებოდეს საკვლევი კულტურა. მართალია, ამ ფერმენტების პროდუცენტები შერჩეული იქნა ყველა საკვები არიდან გამოყოფილ კულტურებს შორის, მაგრამ აღმოჩნდა, რომ ქსილანაზასა და ცელულაზას პროდუცენტების დაახლოებით 90% გამოიყო ამ ფერმენტების პროდუცენტებისათვის სპეციფიკური საკვები არეებიდან. ამ თვალსაზრისით შედარებით მაღალი აქტიურობით გამოირჩევიან *Aspergillus*, *Penicillium* და *Trichoderma*-ს გვარის წარმომადგენლები.

პროდუცენტებს შორის გამოვლენილია თერმოფილური კულტურები - *Aspergillus* გვარის სახეობები - *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus wentii*; სახეობების - *Sporothrichum pulverulentum*, *Chaetomium thermophile* - წარმომადგენლები.

3.4 გამოყოფილი კულტირების ექსტრემოფილობის

ხარისხის დადგენა

გამოყოფილ 212 მიკროსკოპულ სოკოს შორის კვლევის შედეგად დადგინდა, არა მარტო ფერმენტების პროდუცენტების ექსტრემოფილობის ხარისხი, არამედ-დანარჩენი კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხიც. ჩატარებული კვლევების საფუძველზე დავახასიათეთ ექსტრემოფილური (თერმო-, აციდო-, ალკალი- და ჰალოფილური) მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია.

მიკროსკოპული სოკოების ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ მშრალი, სუბტროპიკული კლიმატური ზონიდან (სიღნაღის რეგიონი) გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებში, სადაც ძირითადად შავიმიწა, ყავისფერი და წაბლა ნიადაგებია, შეინიშნება თერმოფილური და თერმოტოლერანტული კულტურების სიჭარბე (50-55%), ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ *Aspergillus*-ის გვარის სოკოების (რომლებიც ყველაზე დიდი რაოდენობით გამოვლინდნენ) 25-30% თერმოფილებს წარმოადგენენ, *Chaetomium*-ის გვარის სოკოების 50% თერმოფილია, *Trichoderma*-ს გვარიდან გამოვლენილი ყველა კულტურა მეზოფილია. ფსიქროტოლერანტობას ავლენდნენ *Fusarium*-ის, *Rhizopus*-ის გვარის წარმომადგენლები. *Penicillium*-ის, *Mucor*-ისა და *Cladosporium*-ის გვარის სოკოებიც დაბალი ტემპერატურის მიმართ ავლენენ ტოლერანტობას, თუმცა ამ გვარის წარმომადგენლებს შორის გამოვლინდა თერმოფილური კულტურებიც.

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოების კულტურების სპორები სიცოცხლის უნარიანობას დაბალ ტემპერატურაზეც ინარჩუნებენ [55, 157, 192]. საქართველოს სუბალპური კლიმატური ზონისათვის დამახასიათებელია ტემპერატურის მაღალი დღეღამური მერყეობა: მცხუნვარე მზიან დღეს, ხშირად საკმაოდ ცივი ღამე ცვლის. ამ რეგიონიდან გამოყოფილი სოკოების უმრავლესობა ფსიქროფილები და ფსოქროტოლერანტები არიან, რომლებიც *Mucor*-ისა და *Mortierella*-ს გვარის წარმომადგენლებში აღმოჩნდნენ.

ტენიან სუბტროპიკულ ზონიდან (აჭარა) გამოვლინდა *Chaetomium*-ის გვარის მიკროსკოპული სოკოს მხოლოდ ერთი თერმოტოლერანტი კულტურა. ჩვენს

მიერ მიღებული შედეგები ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს: თერმოფილურ მოკროსკოპულ სოკოებში ძირითადად გამოვლენილია *Chaetomium*-ის, *Sporothrichum* და *Aspergillus*-ის გვარის სოკოები [25, 55, 133, 181]. ფსიქროფილები კი აღმოჩნდნენ *Mucor*-ის, *Mortierella*-ს *Fusarium*-ის და *Penicillium*-ის გვარების წარმომადგენლები [172, 69].

მიკროსკოპული სოკოების ზრდა-განვითარებაზე, წყალბადიონთა კონცენტრაციის გავლენის შეწავლისას აღმოჩნდა, რომ მშრალი სუბტროპიკული კლიმატური ზონის (სიღნაღი) - ყავისფერი, შავმიწა და ალვიური ნიადაგებიდან გამოვლენილი მიკროსკოპული სოკოების 35% კარგად იზრდებოდა pH 9.0-ის პირობებში, სოკოების გარკვეული ნაწილი (28%) კი, ტოლერანტობას ავლენდა pH-ის ფართო დიაპაზონში, კონტინენტური კლიმატური ზონა (სამცხე-ჯავახეთი), ცნობილია მინერალური წყლებით. აქ ტყის ყომრალი და გაეწერებული ნიადაგები ჭარბობს და ვულკანური ქანებია. ამ ზონიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის გამოვლინდნენ აციდოფილური კულტურები. წაბლა, დამლაშებული ბიცობიანი ნიადაგებიდან (მარნეულის რაიონი) გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის კი, ალკალიფილური კულტურების სიჭარბე შეინიშნებოდა. ჰალოფილური კულტურები ყველაზე დიდი სიჭარბით გამოვლინდნენ ნახევრადუდაბნოს ზონაში - დამლაშებული ბიცობიანი ნიადაგებიდან (მარნეულის რაიონი). ჰალოფილური და ჰალოტოლერანტული მიკროსკოპული სოკოები ასევე გამოვლინდნენ სტეპის ზონაში (სიღნაღის რაიონი), შავმიწა და წაბლა ნიადაგებიდან. მარილის მაღალი კონცენტრაციისადმი რეზისტენტული მიკროსკოპული სოკოები მიეკუთვნებიან *Aspergillus*-ის გვარს, არიან *Penicillium*-ის და *Cladosporium*-ის გვარის სოკოებიც. უნდა აღვნიშნოთ ის ფაქტიც, რომ ჰალოფილური კულტურების უმრავლესობა ალკალიფილები არიან, ზოგიერთი კი თერმოფილიც, რაც ლიტერატურულ მონაცემებს ემთხვევა (ჰალოფილური მიკროორგანიზმები ხასიათდებიან ექსტრემოფილობით რამდენიმე ნიშნის მიხედვით) [40, 60, 82, 113, 158].

სუბალპური ზონიდან (ბაკურიანი) გამოყოფილი კულტურა, რომელიც *Penicillium*-ის გვარიტაა იდენტიფიცირებული, არის ექსტრემალური ჰალოფილური სოკოს კლასიკური წარმომადგენელი, რომელსაც შეუძლია სიცოცხლისუნარიანობა შეინარჩუნოს სხვადასხვა კრიტიკულ პირობებში მოხვედრისას. ეს კულტურა

ალკალიფილურობით ხასიათდება და თერმოტოლერანტულობასაც ავლენს, სუბალპური ზონის ბუნებრივი კლიმატური პირობების გათვალისწინებით კი, სავარაუდოდ ამ მიკროსკოპული სოკოს სპორებს უნარი აქვს სიცოცხლისუნარიანობა შეინარჩუნონ მკვეთრად დაბალი ტემპერატურის პირობებშიც.

ჩატარებული კვლევების საფუძველზე დახასიათებულია გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები, რომლებიც წარმოადგენენ ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტებს (ცხრილი 4, 5, 6). ასევე ისეთი კულტურები, რომლებიც აღნიშნული ფერმენტების მეტაბოლიზმის უნარს არ ავლენენ. მაგრამ შესაძლებელია, რომ ამ შტამებს შესწევდეთ უნარი სხვა მეტაბოლიტების დაგროვებისა ან რომელიმე ტიპის კონვერსიის განხორციელების. ჩვენს მიერ მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ყველა ნიადაგობრივ-კლიმატურ ზონაში არსებობს ტემპერატურის მიმართ განსხვავებულად მგრძნობიარე მიკროსკოპული სოკოები. ხოლო კავკასიის ყველაზე ცხელი რეგიონიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის სჭარბობს თერმოფილები და თერმოტოლერანტები. მჟავე და ტუტე ნიადაგებიდან გამოყოფილ მიკრომიცეტებს შორის უფრო ხშირია აციდო და ალკალიფილების გამოვლენა. რაც შეეხება ჰალოფილურ კულტურებს. მათი უმრავლესობა გამოყოფილია მლაშობი და ბიცობი ნიადაგებიდან და ძირითადად წარმოადგენენ ალკალიფილებს. ან იზრდებიან pH-ის ფართო დიაპაზონში.

ცხრილი 4. ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტი სოკოების ზრდა განვითარების ტემპერატურული დიაპაზონი

№	კულტურა	კულტურის ზრდის ტემპერატურ ული დიაპაზონი	ოპტიმ. t°C	კულტურის დახასიათება
1	<i>Aspergillus terreus</i> K 61	25 ⁰ -50 ⁰ C	45 ⁰ C	თერმოფილი

2	<i>Aspergillus niger</i> K 11	25 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
3	<i>Aspergillus niger</i> N 25	25 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
4	<i>Aspergillus wentii</i> Ts 11			მეზოფილი
5	<i>Penicillium</i> sp.M 44	25 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
6	<i>Aspergillus</i> sp.Ts 12	20 ⁰ -55 ⁰ C	45 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
7	<i>Penicillium</i> sp.Tn 23	25 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
8	<i>Penicillium</i> sp Tn 12	25 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
9	<i>Trichoderma viride</i> N 23	25 ⁰ -35 ⁰ C	27-30 ⁰ C	მეზოფილი
10	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 33	15 ⁰ -40 ⁰ C	30 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
11	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 44	25 ⁰ -55 ⁰ C	40 ⁰ C-45 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
12	<i>Trichoderma viride</i> N 52	20 ⁰ -55 ⁰ C	45 ⁰ C	მეზოფილი
13	<i>Sporotrichum pulverulentum</i> M 29	15 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
14	<i>Aspergillus niger</i> Sj-4-2	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
15	<i>Aspergillus niger</i> Sj 46	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
16	<i>Aspergillus niger</i> Sj 35	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
17	<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
18	<i>Aspergillus wentii</i> Z 6-3	15 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
19	<i>Aspergillus</i> sp. Z 1-7	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
20	<i>Aspergillus</i> sp.Z 9-2	15 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
21	<i>Aspergillus</i> sp Sj 3-1	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
22	<i>Penicillium canescence</i> Sj 4-1	15 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
23	<i>Mucor plumbeus</i> Sj 1	15 ⁰ -40 ⁰ C	35 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
24	<i>Penicillium</i> sp.Sj (β)2	15 ⁰ -40 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
25	<i>Penicillium</i> sp.Sj-51	15 ⁰ -40 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
26	<i>Penicillium</i> sp. Z 5-3	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
27	<i>Sporothrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	20 ⁰ -55 ⁰ C	45 ⁰ C	თერმოფილი

28	<i>Aspergillus niger</i> I 8-1	15 ⁰ -35 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
29	<i>Aspergillus niger</i> I 2-4	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
30	<i>Aspergillus niger</i> Aj 8-3	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
31	<i>Aspergillus terreus</i> I 4-9	20 ⁰ -55 ⁰ C	45 ⁰ C	თერმოფილი
32	<i>Penicillium</i> sp. Aj 14	15 ⁰ -40 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
33	<i>Penicillium</i> sp. Aj 13	15 ⁰ -40 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
34	<i>Penicillium</i> sp. Aj 21	15 ⁰ -40 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
35	<i>Penicillium</i> sp. Aj-2	15 ⁰ -40 ⁰ C	30 ⁰ C	მეზოფილი
36	<i>Chaetomium thermophile</i> Aj 36	15 ⁰ -50 ⁰ C	40 ⁰ C	თერმოტოლერანტი
37	<i>Trichoderma viride</i> I 5-4	25 ⁰ -35 ⁰ C	27-30 ⁰ C	მეზოფილი
38	<i>Trichoderma viride</i> I 6-3	25 ⁰ -35 ⁰ C	27-30 ⁰ C	მეზოფილი
39	<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	25 ⁰ -35 ⁰ C	27-30 ⁰ C	მეზოფილი

ცხრილი 5. ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტი სოკოების ზრდა განვითარება სხვადასხვა pH- ის პირობებში

№	კულტურა	ზრდის pH- დიაპაზონი	ოპტიმ pH-	კულტურის დახასიათება
1	<i>Aspergillus terreus</i> K 61	pH 2.0-9.0	pH 6.5	
2	<i>Aspergillus niger</i> K 11	pH 3.0-8.0	pH 6.0	
3	<i>Aspergillus niger</i> N 25	pH 2.0-10.0	pH 5.5	ალკალიტოლერანტი
4	<i>Aspergillus wentii</i> Ts 11	pH 3.0-8.0	pH 6.0	
5	<i>Penicillium</i> sp.M 44	pH 3.0-8.0	pH 6.0	
6	<i>Aspergillus</i> sp.Ts 12	pH 3.5-10.0	pH 8.5	ალკალიტოლერანტი
7	<i>Penicillium</i> sp.Tn 23	pH 2.0-9.0	pH 6.5	
8	<i>Penicillium</i> sp Tn 12	pH 2.0-9.0	pH 6.5	
9	<i>Trichoderma viride</i> N 23	pH 5.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი
10	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 33	pH 2.0-9.0	pH 6.5	
11	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 44	pH 4.0-8.0	pH 6.0-	
12	<i>Trichoderma viride</i> N 52	pH 3.5-10.0	pH 8.5	ალკალიტოლერანტი

13	<i>Sporotrichum pulverulentum</i> M 29	pH 4.5-6.5	pH 5.0	
14	<i>Aspergillus niger</i> Sj-4-2	pH 4.5-6.5	pH 5.5	
15	<i>Aspergillus niger</i> Sj 46	pH 4.5-6.5	pH 6.0	
16	<i>Aspergillus niger</i> Sj 35	pH 4.5-6.5	pH 6.0	
17	<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	pH 4.5-10.0	pH 7.5	ალკალიტოლერანტი
18	<i>Aspergillus wentii</i> Z 6-3	pH 4.5-9.5	pH 7.5	ალკალიტოლერანტი
19	<i>Aspergillus</i> sp. Z 1-7	pH 2.5-5.5	pH 4.5	აციდოტოლერანტი
20	<i>Aspergillus</i> sp.Z 9-2	pH 2.5-5.5	pH 4.5	აციდოტოლერანტი
21	<i>Aspergillus</i> sp Sj 3-1	pH 4.5-6.5	pH 5.5	
22	<i>Penicillium canescence</i> Sj 4-1	pH 3.0-5.5	pH 4.5	აციდოტოლერანტი
23	<i>Mucor plumbeus</i> Sj 1	pH 2.0-9.5	pH -7.0	ალკალიტოლერანტი
24	<i>Penicillium</i> sp.Sj (β)2	pH 3.5-10.0	pH 8.5	ალკალიტოლერანტი
25	<i>Penicillium</i> sp.Sj-51	pH 4.0-8.0	pH 6.0	
26	<i>Penicillium</i> sp. Z 5-3	pH 4.0-8.0	pH 6.5	
27	<i>Sporotrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	pH 3.5-7.5	pH 6.0	
28	<i>Aspergillus niger</i> I 8-1	pH 2.5-5.5	pH 4.5	აციდოტოლერანტი
29	<i>Aspergillus niger</i> I 2-4	pH 2.0-9.0	pH 6.5	
30	<i>Aspergillus niger</i> Aj 8-3	pH 3.0-8.0	pH 5.5	
31	<i>Aspergillus terreus</i> I 4-9	pH 3.0-7.0	pH 6.0	
32	<i>Penicillium</i> sp. Aj 14	pH 3.0-7.0	pH 6.0	ალკალიტოლერანტი
33	<i>Penicillium</i> sp. Aj 13	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიტოლერანტი
34	<i>Penicillium</i> sp. Aj 21	pH 3.0-8.0	pH 5.5	
35	<i>Penicillium</i> sp. Aj-2	pH 3.5-9.0	pH 6.0	
36	<i>Chaetomium thermophile</i> Aj36	pH 3.5-10.0	pH 8.5	ალკალიტოლერანტი
37	<i>Trichoderma viride</i> I 5-4	pH 3.0-8.5	pH 6.0	
38	<i>Trichoderma viride</i> I 6-3	pH 3.0-8.0	pH 5.5	
39	<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	pH 3.5-9.0	pH 6.0	

ცხრილი 6. ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტი სოკოების ზრდა განვითარება
მარილის (NaCl-ის) სხვადასხვა კონცენტრაციების პირობებში

#	კულტურა	NaCl-ის კონცენტრაციები	NaCl-ის ოპტ. კონცენტრაცია	კულტურის დაზსიათება
1	<i>Aspergillus terreus</i> K 61	0.5M-2.5M	1.5M	არაჰალოფილი
2	<i>Aspergillus niger</i> K 11	0.5M-3 M	2.5M	ზომიერი ჰალოფილი
3	<i>Aspergillus niger</i> N 25	0.5M-2 M	1.5 M	არაჰალოფილი
4	<i>Aspergillus wentii</i> Ts 11	0.5M-2 M	1.5M	არაჰალოფილი
5	<i>Penicillium</i> sp.M 44	0.5M-3 M	2 M	არაჰალოფილი
6	<i>Aspergillus</i> sp.Ts 12	0.5M-3 M	2.5M	ზომიერი ჰალოფილი
7	<i>Penicillium</i> sp.Tn 23	0.5M-2.5M	1.5M	არაჰალოფილი
8	<i>Penicillium</i> sp Tn 12	0.5M	-	არაჰალოფილი
9	<i>Trichoderma viride</i> N 23	0.5M-2.5M	1.5M	არაჰალოფილი
10	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 33	0.5M	-	არაჰალოფილი
11	<i>Chaetomium</i> sp. Ts 44	0.5M-3 M	2.5M	ზომიერი ჰალოფილი
12	<i>Trichoderma viride</i> N 52	0.5M-2.5M	1.5M	არაჰალოფილი
13	<i>Sporotrichum pulverulentum</i> M 29	0.5M-2.5M	1.5M	არაჰალოფილი
14	<i>Aspergillus niger</i> Sj-4-2	0.5M-3 M	2.5M	ზომიერი ჰალოფილი
15	<i>Aspergillus niger</i> Sj 46	1M-2 M	1M	არაჰალოფილი
16	<i>Aspergillus niger</i> Sj 35	0.5M-2 M	1.5M	არაჰალოფილი
17	<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	0.5M-2 M	1.5M	არაჰალოფილი
18	<i>Aspergillus wentii</i> Z 6-3	0.5M-3 M	2.5M	ზომიერი ჰალოფილი
19	<i>Aspergillus</i> sp. Z 1-7	1M-2 M	1M	არაჰალოფილი
20	<i>Aspergillus</i> sp.Z 9-2	1M-2 M	1M	არაჰალოფილი
21	<i>Aspergillus</i> sp Sj 3-1	1M-3 M	2M	არაჰალოფილი

22	<i>Penicillium canescence</i> Sj 4-1	1M-2 M	1M	არაპალოფილი
23	<i>Mucor plumbeus</i> Sj 1	1M-2 M	1M	არაპალოფილი
24	<i>Penicillium</i> sp.Sj (β)2	1M-2 M	1M	არაპალოფილი
25	<i>Penicillium</i> sp.Sj-51	1M-4 M	3M	ექსტრემალური პალოფილი
26	<i>Penicillium</i> sp. Z 5-3	1M-2 M	1M	არაპალოფილი
27	<i>Sporothrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	0.5M-2 M	1M	არაპალოფილი
28	<i>Aspergillus niger</i> I 8-1	0.5M	-	არაპალოფილი
29	<i>Aspergillus niger</i> I 2-4	0.5M-3.5 M	2.5M	ზომიერი პალოფილი
30	<i>Aspergillus niger</i> Aj 8-3	1M-4 M	2.5M	ზომიერი პალოფილი
31	<i>Aspergillus terreus</i> I 4-9	0.5M-2 M	1.5M	არაპალოფილი
32	<i>Penicillium</i> sp. Aj 14	0.5M-2 M	1.5M	არაპალოფილი
33	<i>Penicillium</i> sp. Aj 13	0.5M-2 M	1.5M	არაპალოფილი
34	<i>Penicillium</i> sp. Aj 21	0.5M-2 M	1.5M	არაპალოფილი
35	<i>Penicillium</i> sp. Aj-2	0.5M	-	არაპალოფილი
36	<i>Chaetomium thermophile</i> Aj 36	0.5M	-	არაპალოფილი
37	<i>Trichoderma viride</i> I 5-4	0.5M	-	არაპალოფილი
38	<i>Trichoderma viride</i> I 6-3	0.5M-2.5M	1.5M	არაპალოფილი
39	<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	0.5M	-	არაპალოფილი

3.5 ცელულაზების და ქსილანაზების აქტიური პროდუცენტი ექსტრემოფილური, მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ფიტო და ზოოპათოგენურობის დადგენა

მიკოტოქსიკოლოგიური გამოკვლევების გზით დავადგინეთ, რომ, აქტიური პროდუცენტი, მიკროსკოპული სოკოს კულტურები არ არიან პათოგენურები და

ტოქსიკურები. ეს კი საშუალებას იძლევა მიღებული შტამები გამოყენებულ იქნას სამრეწველო დანიშნულებით, შესაბამისი შემოწმების შემდეგ, ამ კულტურების გამოყენება შესაძლებელია ისეთ დარგებში, როგორცაა მედიცინა და კვების მრეწველობა.

3.6 ცელულაზებისა და ქსილანაზების აქტიური პროდუცენტებისათვის საკვები არეების ოპტიმიზაცია

ცელულაზა/ქსილანაზას პროდუცენტების შერჩევით არ სრულდება შტამი-პროდუცენტის სელექციის პროცესი. შემდეგ ეტაპზე აქტიური პროდუცენტების - ცელულაზა/ქსილანაზას ბიოსინთეზის გაძლიერების მიზნით ხდება საკვები არეების ოპტიმიზაცია და კულტივირების ოპტიმალური პირობების შერჩევა. აღნიშნული ფერმენტების როგორც ეკონომიური ფაქტორის, აქტივობის შეფასების შემდეგ, შეიძლება მსჯელობა სამრეწველო წარმოებაში მათ მიზანმიმართულ გამოყენებაზე.

ცნობილია, რომ მოქმედების სპეციფიკურობის მიხედვით ჰიდროლიზური ფერმენტები და მათ შორის ცელულაზები და ქსილანაზები დაბალი სპეციფიკურობით ხასიათდებიან. ისინი სხვადასხვა სიჩქარით მოქმედებენ როგორც პოლიმერულ, ასევე ოლიგომერულ და დაბალმოლეკულურ (ტეტრამერულ) სუბსტრატებზე. მაღალმოლეკულური სუბსტრატების ჰიდროლიზს ახორციელებს ფერმენტი ენდოგლუკანაზა, ხოლო დაბალმოლეკულური სუბსტრატების - β -გლუკოზიდაზა და ცელობიოჰიდროლაზა. ამ ფერმენტების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა შტამები კი მნიშვნელოვნად განსხვავებული სუბსტრატული სპეციფიკურობით ხასიათდებიან. საკვები არის შემადგენლობის შერჩევითა და ცალკეული კომპონენტების ოპტიმალური თანაფარდობის დადგენით შესაძლებელია ჰიდროლიზური ფერმენტების აქტივობის გაზრდა.

ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა, მოგვეხდინა ჩვენს მიერ შერჩეული ცელულაზებისა და ქსილანაზების შედარებით აქტიური პროდუცენტი- შტამების საკვები არეებისა ოპტიმიზაცია და ამით, თუ შესაძლებელი იქნებოდა, კიდევ უფრო გაგვეზარდა შესაბამისად ცელულაზებისა და ქსილანაზების აქტივობები.

ჩვენს მიერ შერჩეული იქნა სამი თერმოფილური შტამი: *Aspergillus wentii* Z 9-7, *Aspergillus terreus* K 61, *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6, აქტიური პროდუცენტი - მეზოფილი შტამი - *Trichoderma viride* I 7-5, ასევე შტამი *Penicillium canescence* Sj 4-1, რომელიც ქსილანაზას აქტიური პროდუცენტია და არ წარმოქმნის ცელულაზას.

ცელულაზების და ქსილანაზების სინთეზი შესაძლებელია, საკვებ არეში სუბსტრატის ან სხვა სპეციფიკური ინდუქტორის არსებობის შემთხვევაში [1, 24, 89, 92, 115, 116, 133]

დადგენილია, რომ უჯრედგარე ცელულაზების ინდუქცია ხორციელდება β -1,4 ბმების არსებობისას [1, 3, 25, 116, 181]. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ფერმენტ ქსილანაზას სინთეზი ინდუცირებადი პროცესია, ზემოთქმულიდან გამომდინარე იგი დამოკიდებულია საკვები არის შემადგენლობაზე.

საკვები არის ოპტიმიზაციის მიზნით, შევისწავლეთ ნახშირბადის, აზოტის ფოსფორის სხვადასხვა ნაერთის გავლენა ფერმენტ ცელულაზას და ქსილანაზას სინთეზის უნარზე.

მაღალაქტიური ცელულაზას მისაღებად საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროდ გამოვცადეთ თივა, ალაოს ღივები, ხორბლის ქატო, ჩაისა და ღვინის მრეწველობის ნარჩენები, გაზეთის ქაღალდი, ფილტრის ქაღალდი, მიკროკრისტალური ცელულოზა, კარბოქსილმეთილცელულოზა - 1%-ის რაოდენობით. დისაქარიდები და მონოსაქარიდები, გლუკოზა - ნახშირბადის მიხედვით 0,8%-ის რაოდენობით. ყველაზე მაღალი ცელულაზური აქტივობა აღინიშნებოდა მიკროკრისტალური ცელულოზის შეტანისას (ცხრილი 5).

ცელულაზას მისაღებად გამოვიყენეთ შემდეგი შემადგენლობის თხიერი არე (%-ში): მიკროკრისტალური ცელულოზა-1, NaNO_3 -0,3, KH_2PO_4 -0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,05, სიმინდის ექსტრაქტი-1,5. ცელულაზას პროდუცენტებისათვის საწყისი საკვები არე ოპტიმალური აღმოჩნდა. (pH 4.5-5.5).

შესწავლილია ნახშირწყლების, კერძოდ: მონოსაქარიდების, დისაქარიდების, ბიოპოლიმერების, საქაროსპირტების და ნახშირწყლების ნარევით მდიდარი მრეწველობის სხვადასხვა ნარჩენის გავლენა პროდუცენტი შტამების მიერ ფერმენტ ქსილანაზას სინთეზის უნარზე. სოიას შემცველ მინერალურ არეს 1%-ის

ოდენობით ვამატებდით სხვადასხვა საკვები არის კომპონენტს, ფერმენტის სინთეზის ინდუქციის ან რეპრესიის ეფექტის დასადგენად.

მაღალი ქსილანაზური აქტივობა შეიმჩნეოდა საკვებ არეში ქსილანის და ნამჯის თანაობისას (ცხრილი. 7).

ცხრილი 7. ნახშირწყლების სხვადასხვა წყაროების გავლენა ცელულაზა/ქსილანაზას ბიოსინტეზზე სელექციურად შერჩეულ შტამების მიერ

კულტურა	ცელულაზა ფილტრის ქაღალდი, ერთ/მლ			ქსილანაზა, ერთ/მლ		
	სუბსტრატები					
	MCC (1 %)	MCC (2 %)	Malt sprouts	Wheat straw	Xylane	SF
<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	0.88	0.80	0.66	10.0	11.0	3.8
<i>Aspergillus terreus</i> K 61	0.92	0.75	0.35	9.0	9.0	7.5
<i>Sporothrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	0.66	0.70	0.40	13.0	15.0	15.4
<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	1.05	0.98	0.75	4.3	3.6	6.0
<i>Penicillium canescence</i> Sj 41	-	-	-	14.0	12.0	12.0

ამგვარად ჩატარებული კვლევის შედეგად შერჩეულია ქსილანაზა/ცელულაზას თერმოფილური შტამები და დადგენილია მათი ელემენტარული კულტივირების პირობები რომლებიც იძლევა საშუალებას სიღრმული კულტივირების პირობებში ვაწარმოოთ ფერმენტის მეწარმე შტამის სიღრმული კულტივირება.

3.7 ცელულაზების პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას

ბუნებრივი ფაქტორები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ მიკროორგანიზმების ცვალებადობაზე, რის შედეგადაც წარმოიქმნება აქტიური ფორმები, რომლებიც განსხვავებულად იწვევენ განსაზღვრული სუბსტრატის ტრანსფორმაციას. [178]

ამიტომ შემდგომ ეტაპზე, აქტიური პროდუცენტების ბიოსინთეზის გაზრდის მიზნით, მოვახდინეთ საკვები არეების ოპტიმიზაცია და დავადგინეთ სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური პირობები. ორგანიზმის ბიოსინთეზის უნარის გაზრდის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან გზას კონკრეტული მეტაბოლიტის მიმართ, ისე რომ არ შეიცვალოს მისი გენეტიკური აპარატი, წარმოადგენს კულტივირებისათვის ოპტიმალური პირობების შერჩევა.

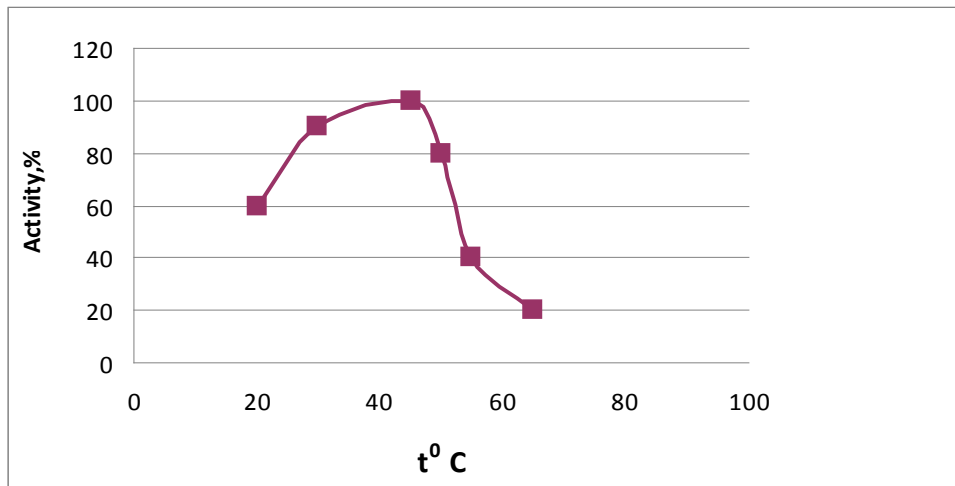
ვინაიდან, მიკროორგანიზმების ზრდისა და ფიზიოლოგიური აქტიურობის გამოვლენისათვის ტემპერატურა ყველაზე მნიშვნელოვანი ფაქტორია [148],

პირველ რიგში შესწავლილ იქნა ტემპერატურის გავლენა ამ თუ იმ კულტურის მიერ პროდუცირებული ფერმენტის აქტიურობაზე.

ფერმენტების აქტიური პროდუცენტების ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურის გათვალისწინებით, მათი სიღრმული კულტივირება შესაბამისად ხდებოდა სხვადასხვა ტემპერატურაზე: თერმოფილების კულტივირება მიმდინარეობდა 30°C-ის ზევით 55°C-მდე,

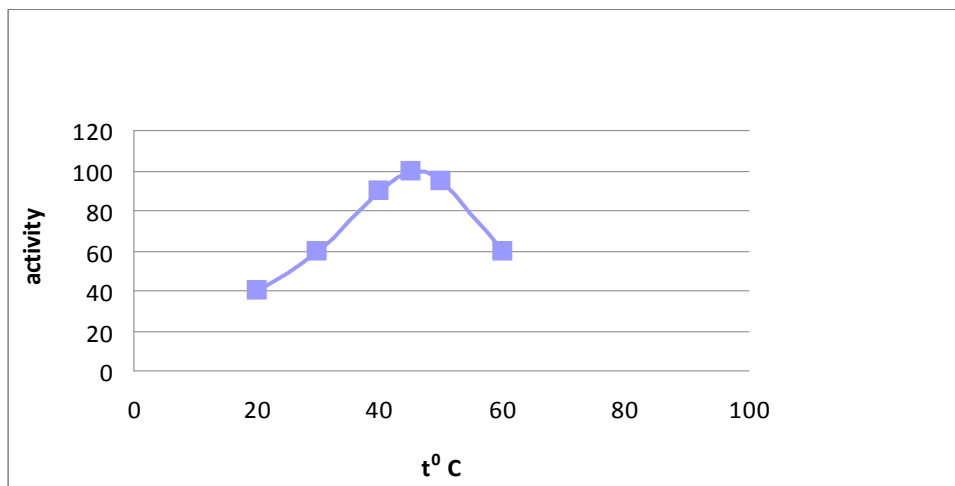
ცელულაზას პროდუცენტებს შორის დადგენილია თერმოფილური შტამების: *Aspergillus wentii* Z 9-7, *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6-ის და მეზოფილური კულტურის *Trichoderma viride* I 7-5 -ის კულტივირების პირობები.

თერმოფილი კულტურის *Aspergillus wentii* Z 9-7-ის სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური ტემპერატურა უდრის 42°C. *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6-ის სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური ტემპერატურა არის 40°C. კულტურა *Trichoderma viride* I 7-5-ის ოპტიმალური ტემპერატურაა 30°C (სურათი 2).



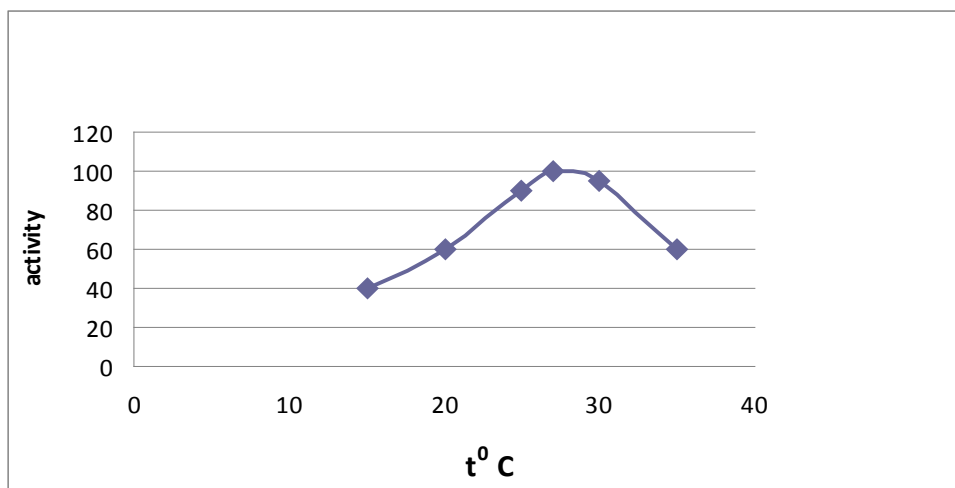
ს)

შტამი – *Aspergillus wentii* Z 9-7



ბ)

შტამი - *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6



გ) შტამი– *Trichoderma viride* I 7-5

სურათი 2. ტემპერატურის გავლენა ცელულაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირების პირობებში

ცდის პირობები:

ტემპერატურა იცვლებოდა 20⁰-დან 60⁰-მდე, 5⁰-ის ინტერვალით;

საკვები არის pH 5.5

ასევე, მიკროორგანიზმების ფიზიოლოგიურ აქტიურობაზე დიდ გავლენას ახდენს საკვები არის pH. საკმაოდ ბევრი ლიტერატურული მონაცემებია ცნობილი pH-ის საწყისი მნიშვნელობისა და მისი ცვლილების დამოკიდებულების შესახებ. pH-ს მნიშვნელობის შეცვლით, შესაძლებელია ნივთიერებათა ცვლის საბოლოო პროდუქტების დაგროვების ხარისხობრივი ცვლილება.

ამ შემთხვევაშიც მხედველობაში მივიღეთ აღნიშნული კულტურების ზრდისათვის ოპტიმალური წყალბადიონთა კონცენტრაცია. მიკროსკოპული სოკოების კულტურების კულტივირებას ვაწარმოებდით სხვადასხვა pH-ის მქონე არეებში: pH 3.0-დან pH 11.0-ის ჩათვლით, 0.5 pH-ის ინტერვალით.

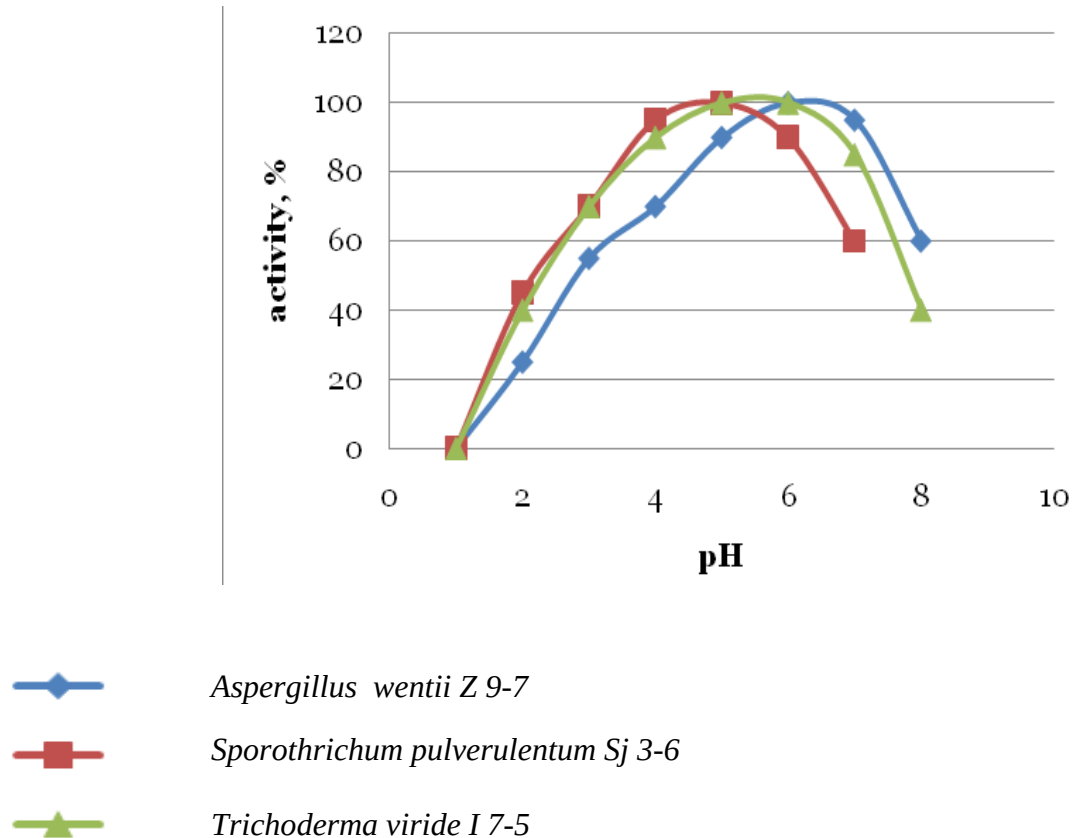
ჩატარებული კვლევების შედეგად დადგენილი იქნა:

Sporothrichum pulverulentum Sj 3-6 - ისათვის ოპტიმალურია pH- 4.5.

Aspergillus wentii Z9-7- ისათვის - pH-7.0

Trichoderma viride I 7-5- ისათვის pH-6.0

მიღებული შედეგები წარმოდგენილია მე - 3 სურათზე



ცდის პირობები: ტემპერატურა – 25-40⁰C; საკვები არის pH იცვლებოდა 3.0-დან – 11-მდე, 0.5 ინტერვალით.

სურათი 3. pH-ის გავლენა ცელულაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირების პირობებში

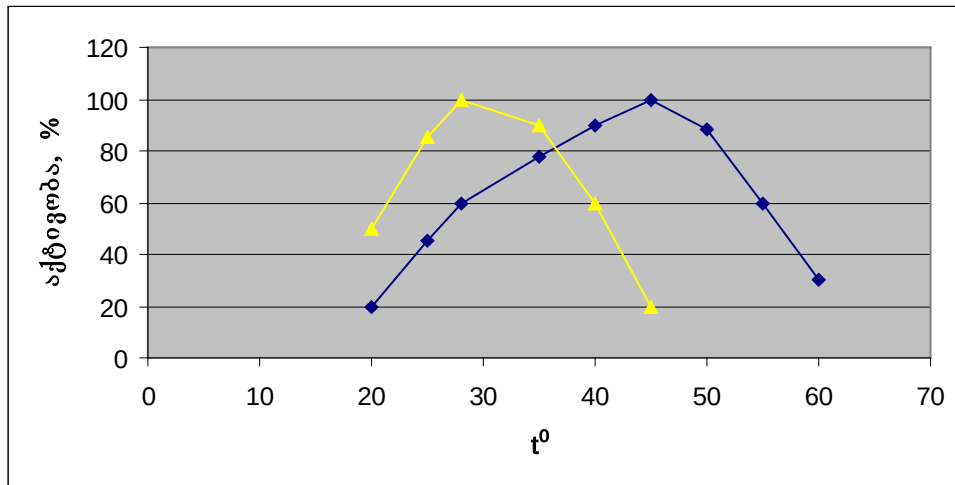
3.8 ქსილანაზის პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას

ქსილანაზას პროდუცენტებს შორის დადგენილია თერმოფილური შტამების: *Aspergillus wentii* Z 9-7, *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6-ის და მეზოფილური შტამის *Penicillium canescence* Sj 4-1-ის კულტივირების პირობები. ეს უკანასკნელი საინტერესოა, რადგანაც ქსილანაზის მაღალი აქტივობის ფონზე ხასიათდება

ნულოვანი ცელულაზის აქტივობით. ასეთი შტამები კი ბუნებაში იშვიათი გამონაკლისია.

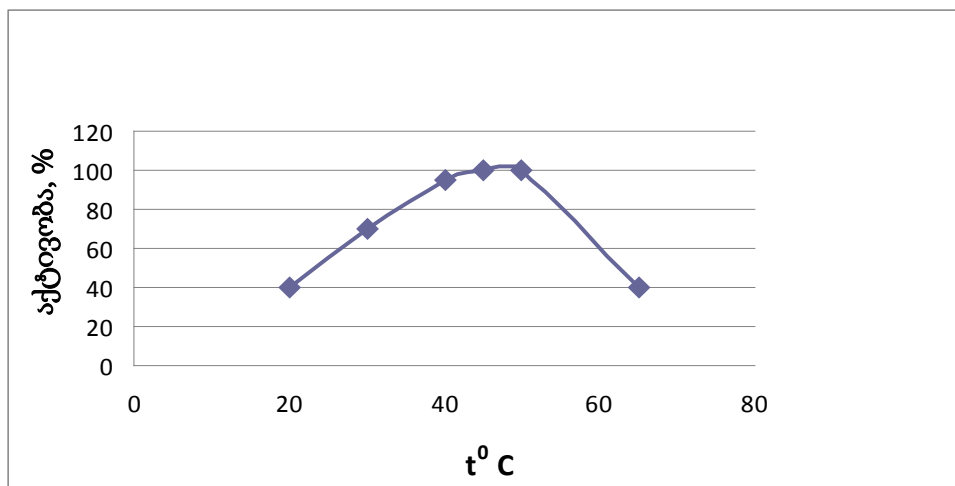
აღმოჩნდა რომ, შტამი- *Penicillium canescence* Sj 4-1 მაღალ - ქსილანაზურ აქტივობას ამჟღავნებს 27°C-ზე, ხოლო შტამები - *Aspergillus wentii* Z 9-7 და *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6 – 40-42°C-ზე.

მიღებული შედეგები წარმოდგენილია მე-4 სურათზე.



ა)

შტამები: 1. *Penicillium canescence* Sj 4-1
2. *Aspergillus wentii* Z 9-7

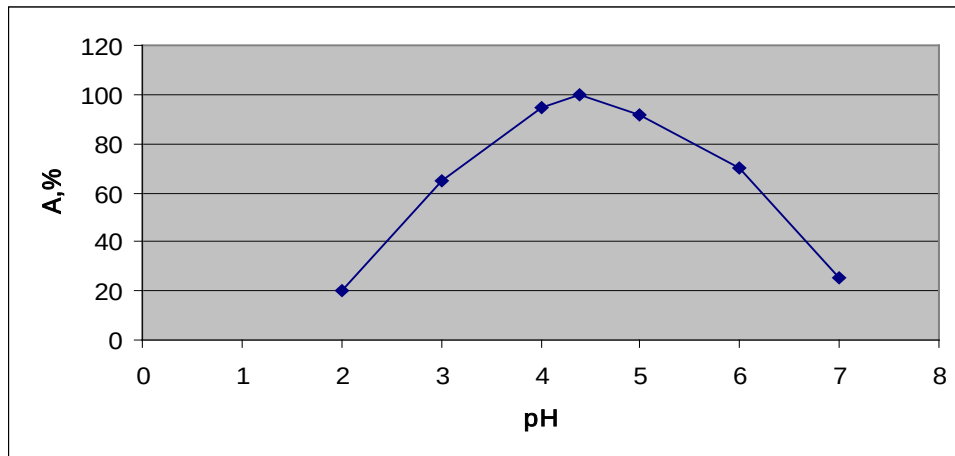


ბ)

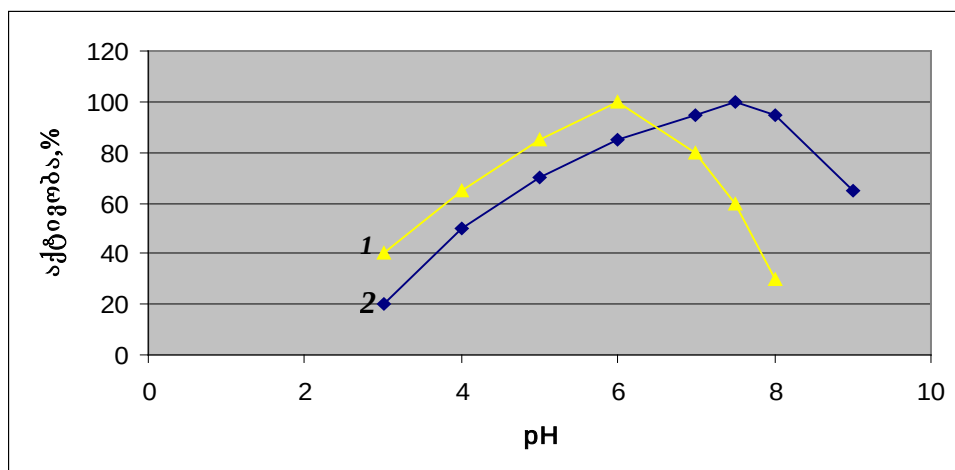
შტამი - *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6

სურათი 4. ტემპერატურის გავლენა ქსილანაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირების პირობებში

ქსილანაზას ბიოსინთეზზე pH-ის გავლენის შესწავლის დროსაც მხედველობაში მიიღებოდა აღნიშნული კულტურების ზრდის ოპტიმალური pH. რადგან შტამი - *Aspergillus wentii* Z 9-7- ალკალიტოლერანტია სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა pH 6,5-დან pH 10-ის ჩათვლით. ეს კულტურა ყველაზე დიდი რაოდენობით ქსილანაზას წარმოქმნის pH 7,5-ზე. უფრო ტუტე არისკენ გადახრის შემთხვევაში აქტივობა რამდენადმე მცირდება, მაშინ როდესაც pH 5,5-ზე აქტიობის მხოლოდ 25% -ია დარჩენილი და ნეიტრალურ pH -ზე აქტიობა პრაქტიკულად 0-ს უტოლდება. კულტურების - *Penicillium canescens* Sj 41 და *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6 ის ოპტიმალური pH- შესაბამისად არის 4,5-5.0 (სურათი 5).



ა) შტამი- *Penicillium canescens* Sj 41



ბ) შტამები: 1 *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6. 2. *Aspergillus wentii* Z 9-7

სურათი 5. pH-ის გავლენა ქსილანაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირების პირობებში

აღსანიშნავია, რომ, უმეტეს შემთხვევაში, თერმოფილების ტემპერატურის ოპტიმუმი სიღრმული კულტივირებისას შეადგენს 40-45°C, ხოლო მეზოფილური კულტურებისათვის – 30-35°C. მიკროსკოპული სოკოების სიღრმულ კულტივირებაზე pH-ის გავლენის შესწავლამ გვიჩვენა რომ, ალკალიფილების pH ოპტიმუმი pH-7.0-ზე უფრო მეტია, აციდოფილების კი უფრო ხშირად მერყეობს pH 3.0-დან pH 4.5-მდე.

უნდა აღინიშნოს რომ, აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH ხშირად არ შეესაბამება გარემოს წყალბადიონთა კონცენტრაციას. ყველაზე აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH-იც კი ხანდახან ოდნავ უახლოვდება დაბალ pH-ს. (pH-5.0), მაშინ როდესაც მათი ზრდის pH ოპტიმუმი არის pH-2.0.

ამდენად მოსაზრება, რომ აციდოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები აუცილებლად უნდა ხასიათდებოდნენ მაღალი მჟავე სტაბილურობით, ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებულ ფერმენტებთან შედარებით ყოველთვის არ არის მართებული. მიუხედავად ამისა არსებობს მეტი ალბათობა იმისა რომ, აციდოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები ხასიათდებოდნენ შედარებით მაღალი მდგრადობით საინკუბაციო არის მჟავიანობის მიმართ.

ამიტომ მიკროსკოპული სოკოების აციდოფილური კულტურები, რომლებიც წარმოადგენენ ამ თუ იმ ფერმენტის პროდუცენტებს, იძლევა საშუალებას მომავალში მიღებული იქნას სტაბილური მჟავემდეგი ფერმენტი. რაც შეეხება მიკროსკოპული სოკოების ალკალიფილურ კულტურებს, მათგან გამოყოფილი ფერმენტები ხასიათდებიან მკვეთრად გამოხატული რეაქციის ტუტე ოპტიმუმით.

სავარაუდოა რომ, მიკროორგანიზმების უჯრედების მდგრადობა მჟავიანობის ან ტუტეობის მიმართ აიხსნება მათი სტრუქტურული და მეტაბოლური განსაკუთრებულობით.

ამ მონაცემების გათვალისწინებით ყველა შერჩეული კულტურისათვის (თერმოფილი, ალკალიფილი, აციდოფილი, ჰალოფილი), როგორც ფერმენტების პროდუცენტებისათვის დადგენილი იქნა სიღრმული კულტივირების პირობები.

სიღრმული კულტივირების ხანგრძლივობის შესწავლის მიზნით მიკროსკოპულ სოკოების შერჩეული შტამები იზრდებოდა თხევად საკვებ არეში 250 მლ-იან

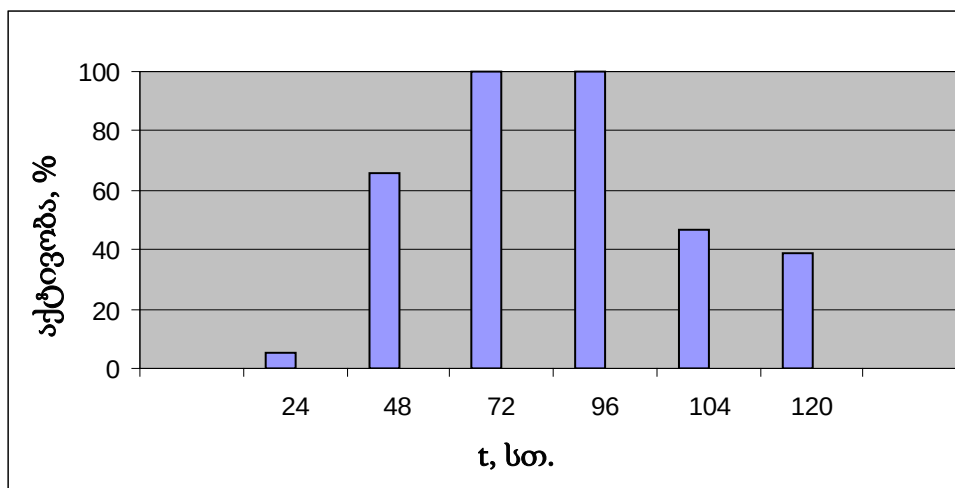
ერლენმეიერის კონუსურ კოლბებში, თერმოსტატირებულ სანჯღრეველაზე (180-200 ბრ/წთ), 28-45°C-ზე (შტამების ოპტიმალური ტემპერატურის გათვალისწინებით).

საკვებ არეებში შესაბამისად ცელულაზების, ქსილანაზების დაგროვების დინამიკის გამოსავლენად ფერმენტების პროდუცენტები იზრდებოდნენ 7 დღის განმავლობაში და მეორე დღიდან ყოველდღე ისაზღვრებოდა აღნიშნული ფერმენტების აქტივობები მიღებული შედეგების თანახმად, ძირითადად ყველა ფერმენტის აქტივობა ვლინდება შტამების განვითარების დასაწყისიდან და ყველაზე მაღალი აქტივობები აღინიშნება მე-3 დღიდან და გრძელდება მე-5 დღემდე, იმის მიხედვით თუ რომელ ფერმენტს პროდუცირებს ცდისთვის აღებული შტამი.

ჩატარებული კვლევების შედეგად დადგინდა, რომ თითქმის ყველა შერჩეული შტამის მიერ წარმოქმნილი ცელულაზასათვის კულტივირების ხანგრძლიობის ოპტიმუმი იწყება 72საათიდან და ნარჩუნდება 96 საათის განმავლობაში. ამდენად შესაძლებელია კულტივირება ვაწარმოოთ 3 დღე-ღამე. გამონაკლისს წარმოადგენს შტამი - *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6, რომლის ხანგრძლიობის ოპტიმუმი მიიღწევა 96-სთ-ის შემდეგ. ქსილანაზასათვის კულტივირების ხანგრძლიობის ოპტიმუმია 72 საათი. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ *Trichoderma* –ს გვარის სოკოები მაღალ აქტივობას უკვე 60 საათიდან აღწევენ.

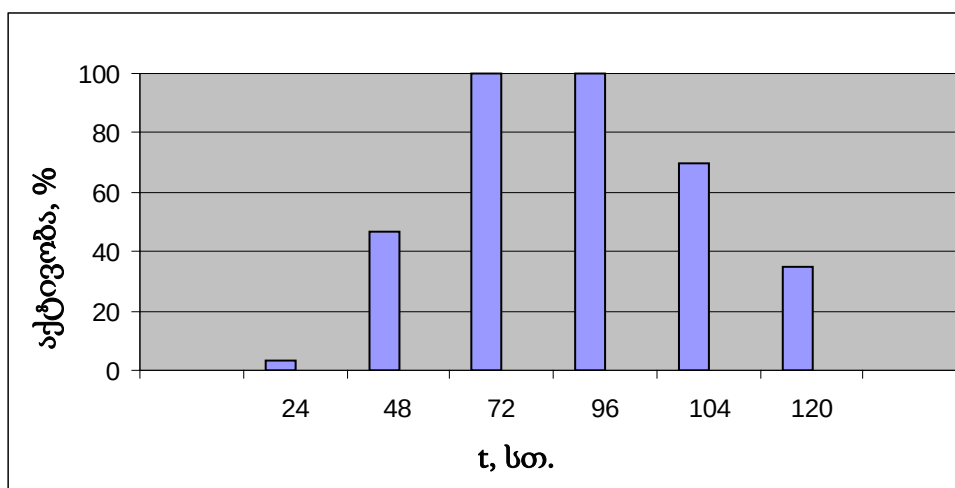
თვალსაჩინოებისათვის გრაფიკებზე მოცემულია 4 შტამის - *Trichoderma viride* I 7-5 (მეზოფილი), *Penicillium canescence* Sj 41(მეზოფილი), *Aspergillus wentii* Z 9-7 (თერმოფილი).

და *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6 (თერმოფილი) მიერ პროდუცირებული ცელულაზას, ქსილანაზას ბიოსინთეზზე კულტივირების ხანგრძლიობის გავლენა. სურათი 6 და 7.



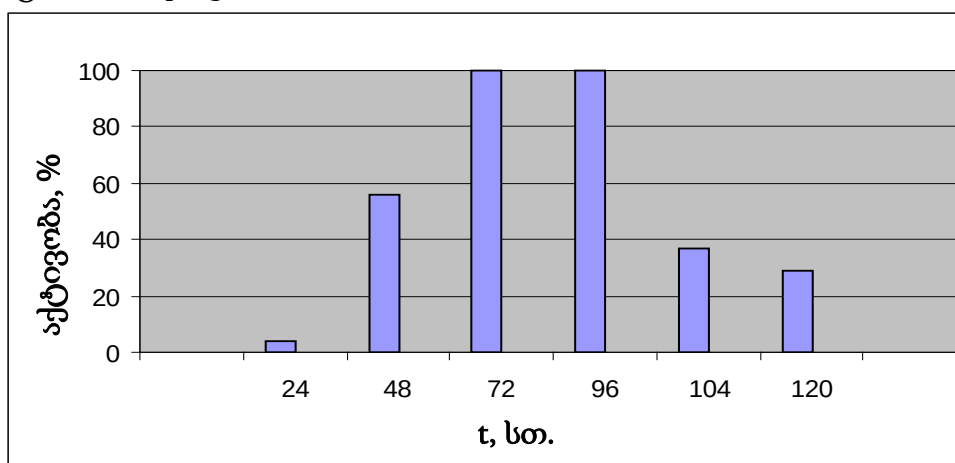
ა)

შტამი – *Trichoderma viride* I 7-5



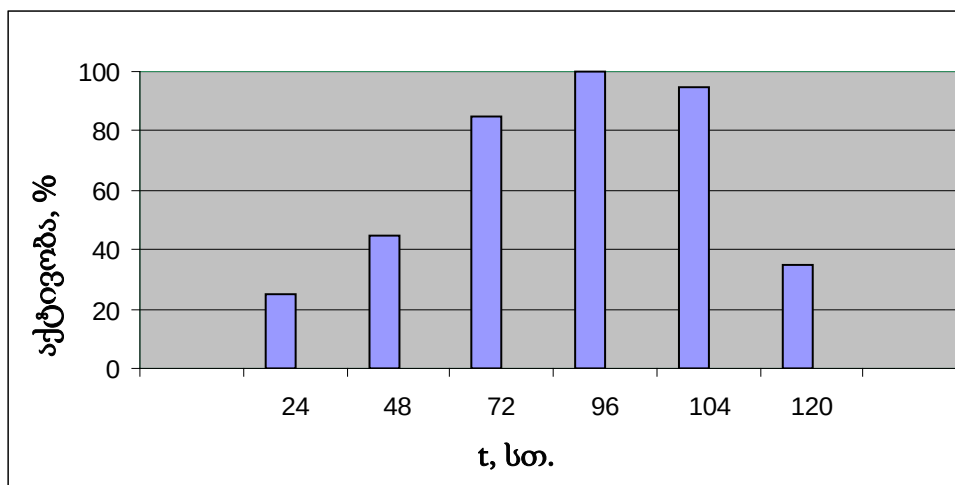
ბ)

შტამი – *Aspergillus terreus* K 61



გ)

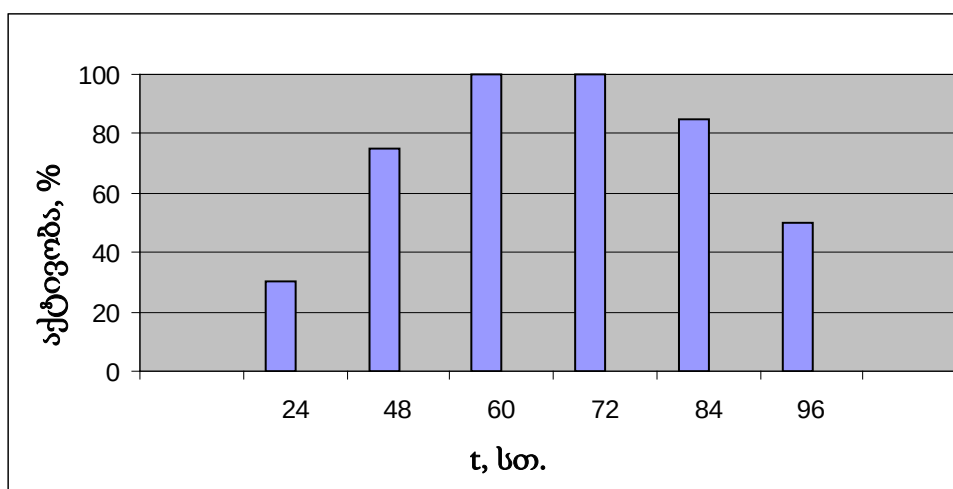
შტამი – *Aspergillus wentii* Z9-7



დ)

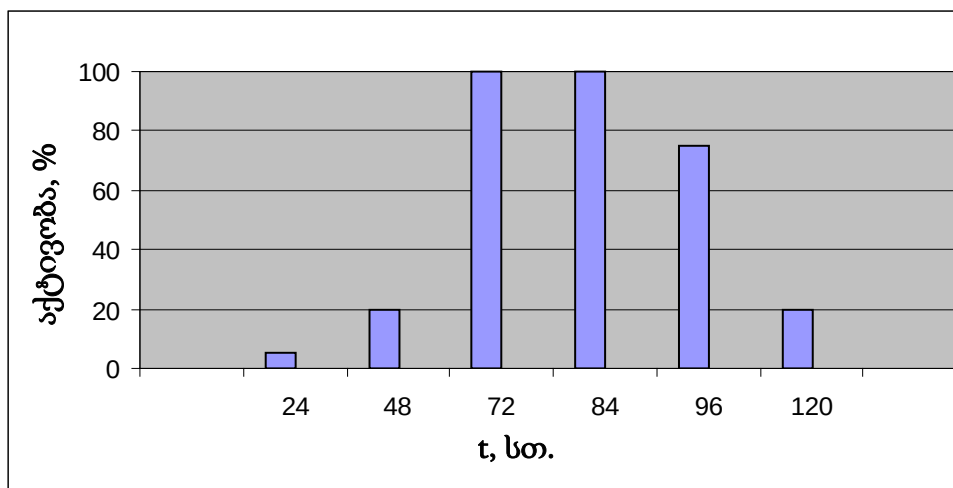
შტამი— *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6

სურათი 6. კულტივირების ხანგრძლიობის გავლენა ცელულაზას ბიოსინთეზზე



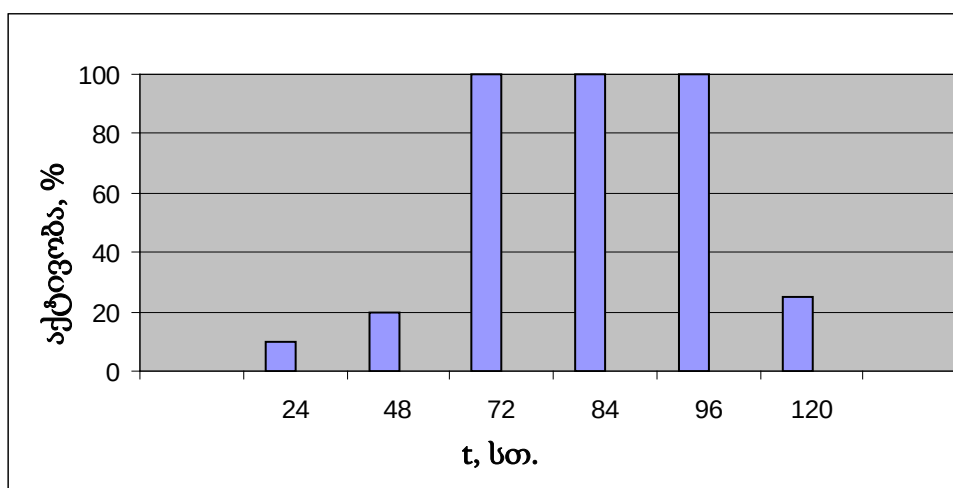
ა)

შტამი— *Trichoderma viride* I 7-5



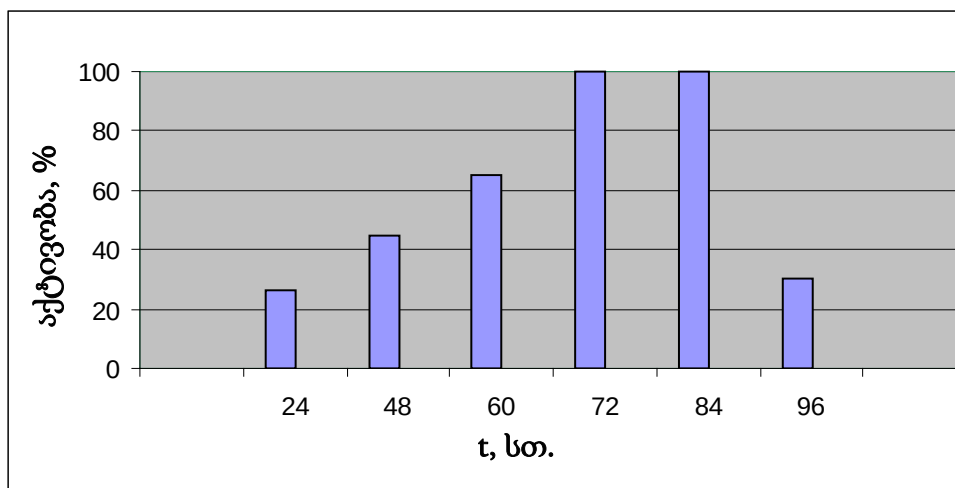
ბ)

შტამი - *Penicillium canescence* Aj13



ბ)

შტამი – *Aspergillus wentii* Z9-7



დ)

შტამი – *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6

სურათი 7. კულტივირების ხანგრძლიობის გავლენა ქსილანაზას ბიოსინთეზზე

საბოლოოდ შერჩეული იქნა ცელულაზას და ქსილანაზის აქტიური პროდუცენტებისათვის კულტივირების ოპტიმალური პირობები და საკვები არეები, რის საფუძველზეც შტამების მიერ წარმოქმნილი ფერმენტების აქტივობები გაზრდილია 4-189% მდე (ცხრილი 8).

ცხრილი 8. ცელულაზას და ქსილანაზას გაზრდილი აქტივობები

№	კულტურა	შტამების მიერ პროდუც. ფერმენტები	საწყისი აქტივობები ერთ/მლ	აქტივობები, ზრდის ოპტიმალურ პირობებში ერთ/მლ	გაზრდილი აქტივობები %
1	<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	ცელულაზა	0.88	0.92	4
2	<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	ქსილანაზა	3.8	11.0	189
3	<i>Sporothrichum</i>	ცელულაზა	0.66	0.75	13

	<i>pulverulentum</i> Sj 3-6				
4	<i>Sporothrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	ქსილანაზა	15.4	15.4	0
5	<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	ცელულაზა	1.05	1.25	8.4
6	<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	ქსილანაზა	6.0	6.0	0
7	<i>Penicillium canescence</i> Sj 4-1	ქსილანაზა	12.0	14.0	16

მიღებული შედეგები კიდევ ერთხელ ადასტურებს, თუ რა დიდი მნიშვნელობა ენიჭება გარემო ფაქტორებისა და საკვები არის სწორად შერჩევას, მიკროორგანიზმების სიცოცხლისუნარიანობასა და მათ უნარზე, წარმოქმნან განსაზღვრული ფერმენტები დიდი ინტენსივობით.

თავი 4

ცელულაზებისა და ქსილანაზების ფერმენტული პრეპარატების დახასიათება, ფერმენტული პრეპარატების მოქმედებების ოპტიმუმების დადგენა

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტები უფრო მაღალ რეზისტენტულობას ამჟღავნებენ სხვადასხვა კრიტიკული პირობების მიმართ და ინარჩუნებენ აქტივობას ხანგრძლივი შენახვის პირობებში, რითაც განსაკუთრებულ ინტერესს წარმოადგენენ მრეწველობისათვის. ამდენად, მნიშვნელოვანია ამ კულტურებიდან ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატების მიღება და მათი დახასიათება.

4.1 ტექნიკური პრეპარატების მიღება

საკვლევი ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატის მიღებისას გამოვიყენეთ საერთო სქემა. კერძოდ, აღნიშნული კულტურების სიღრმული კულტივირების შედეგად მიღებულ სითხეს ვფილტრავდით, შემდეგ კულტურალურ სითხეს ვაციებდით (4°C) და ვუმატებდით სხვადასხვა რაოდენობის ორგანულ გამხსნელებს: აცეტონს, ეთილისა და იზოპროპილის სპირტს. აცეტონითა და იზოპროპილის სპირტით გამოლექვისას წარმოიქმნებოდა შენელებულად ფორმირებადი ნალექი, რაც აძნელებდა გაფილტვრით, ცენტრიფუგირებით ან სხვა ხერხით სუსპენზიიდან დალექილი ცილის მოცილებას. ამ მეთოდით ძირითადი ფერმენტის საერთო აქტივობის გამოსავალი 30-40%-ს არ აღემატებოდა. რაც შეეხება ეთილის სპირტს, ამ ორგანული გამხსნელის გამოყენებით გამოლექილი ფერმენტი კარგად ფორმირდებოდა და რაც მთავარია, ფერმენტის გამოსავალი გაცილებით მეტი იყო. 4 მოცულობა სპირტის დამატება ერთ მოცულობა ფერმენტულ ხსნარზე საშუალებას გვაძლევდა პრეპარატის სახით გამოგვეყო 80-85%. ცელულაზების და ქსილანაზების ფერმენტული პრეპარატები. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია მე-9 ცხრილში, სადაც მოცემულია კულტურალური სითხისა და ორგანული

გამხსნელების ის მოცულობითი შეფარდებები, რომლებიც აქტივობის მიხედვით მაქსიმალურ გამოსავალს იძლეოდნენ. ცხრილიდან ჩანს, ყველაზე ეფექტური აღმოჩნდა ეთილის სპირტით და ამონიუმის სულფატით გამოლექვა. ჩვენ ავირჩიეთ ცელულაზური პრეპარატების მიღება ეთილის სპირტით, როგორც უფრო ეკონომიურის. გამოყოფილი ფერმენტული პრეპარატების აქტივობები, შესაბამისად, გამოისახებოდა ერთეულებში შეფარდებით 1 გრამ მშრალ პრეპარატზე.

ცხრილი 9. მიკროსკოპული სოკოების კულტურალური ფილტრატებიდან ფერმენტების დალექვა ორგანული გამხსნელებით და ამონიუმის სულფატით

	ორგანული გამხსნელები	შეფარდება ხსნარის გამხსნელთან (v/v)	ცელულაზას გამოსავლიანობა, %	შეფარდება ხსნარის გამხსნელთან (v/v)	ქსილანაზას გამოსავლიანობა, %
1	ეთილის სპირტი	1:4	80	1:3.5	85
2	აცეტონი	1:2	60	1:2,5	55
3	ამონიუმის სულფატი	0.45	80	0.45	85
4	იზოპროპანოლი	1:1	55	1:2	68

მიღებული იქნა ცელულაზას აქტიური პროდუცენტი - სამი სხვადასხვა გვარის მიკროსკოპული სოკოს ფერმენტული პრეპარატები, ასევე ქსილანაზას აქტიური პროდუცენტი – შტამის- *Penicillium canescence* Sj 4-1-ის ფერმენტული პრეპარატი (ცხრილი 10)

ცხრილი 10. შერჩეული შტამების ცელულაზას და ქსილანაზას ფერმენტული პრეპარატების აქტივობები

შტამები	FPA	CMCase	Xylanase	β-Glucosidase
	ერთ/გრ	ერთ/გრ	ერთ/გრ	ერთ/გრ
<i>Sporothrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	90	800	940	67
<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	110	1100	750	95
<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	120	1200	1200	110
<i>Penicillium canescence</i> Sj 41	-	-	1420	-

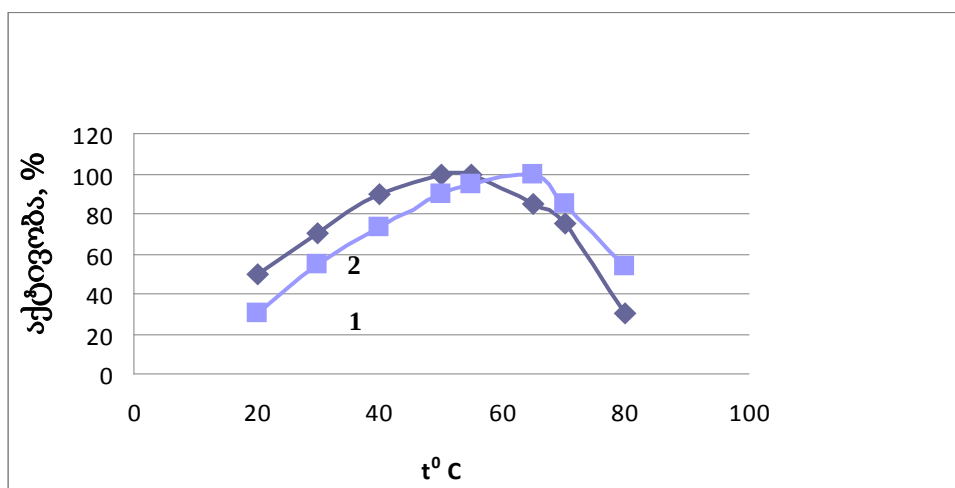
4.2 ცელულაზების მოქმედებების ტემპერატურული ოპტიმუმების დადგენა

სავარაუდოთ ჩვენს მიერ მიღებული თერმოფილი შტამები ჩვეულებრივ მეზოფილურ კულტურებზე უფრო მაღალი თერმომედევობის მქონე ცელულაზას უნდა წარმოქმნიდნენ. ამიტომ თავდაპირველად დავადგინეთ თილის სპირტით მიღებული ფერმენტულ პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმები. ამისათვის ფერმენტულ აქტივობებს ვზომავდით 20°C-დან 80°C-მდე ტემპერატურულ ინტერვალში, სტანდარტული მეთოდით და გამოვსახავდით პროცენტებში მაქსიმალურთან შედარებით. მეთოდურად ცელულაზების ოპტიმუმების დადგენის მიზნით ფერმენტული პრეპარატები იხსნებოდა 0,05M აცეტატურ ბუფერში, pH 4.7. ნალექი შორდებოდა ცენტრიფუგირებით (2500ბრ/წთ, 10წ.) ამავე პრეპარატებში ქსილანაზას მოქმედების ოპტიმუმის დასადგენად პრეპარატი იხსნებოდა 0,05M Na-ციტრატულ ბუფერში, pH 4,4.

თერმოფილური და მეზოფილური შტამების მიერ პროდუცირებული ცელულაზების შესადარებლად, შესწავლილ იქნა მეზოფილური და თერმოფილური ფერმენტული პრეპარატები. ცხადია, მათ უმნიშვნელოვანეს მახასიათებელს წარმოადგენს მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი. ამიტომ პირველ ეტაპზე

შესწავლილი იქნა ორი ძირითადი შტამის - *Trichoderma viride* I 7-5 (მეზოფილი), *Aspergillus wentii* Z 9-7 (თერმოფილი) მიერ პროდუცირებული ცელულაზების ფერმენტული პრეპარატების ეს თვისებები.

ტემპერატურული ოპტიმუმების დადგენამ აჩვენა, რომ თერმოფილი შტამის - *Aspergillus wentii* Z 9-7-ის ცელულაზა მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებს 60°C-ზე, მაშინ როცა მეზოფილური შტამის ცელულაზას ტემპერატურული ოპტიმუმი - 45-50°C დიაპაზონში მდებარეობს (სურათი 8.) ამ შემთხვევაში 10 ცელსიუსის გრადუსით მეტი ტემპერატურული ოპტიმუმი ძალზედ მნიშვნელოვანია, თუნდაც იმიტომ, რომ უახლოვდება პასტერიზაციის ტემპერატურას (65°C) რომლის დროსაც მიმდინარე პროცესი სტერილურად უნდა ჩაითვალოს.



შტამები:

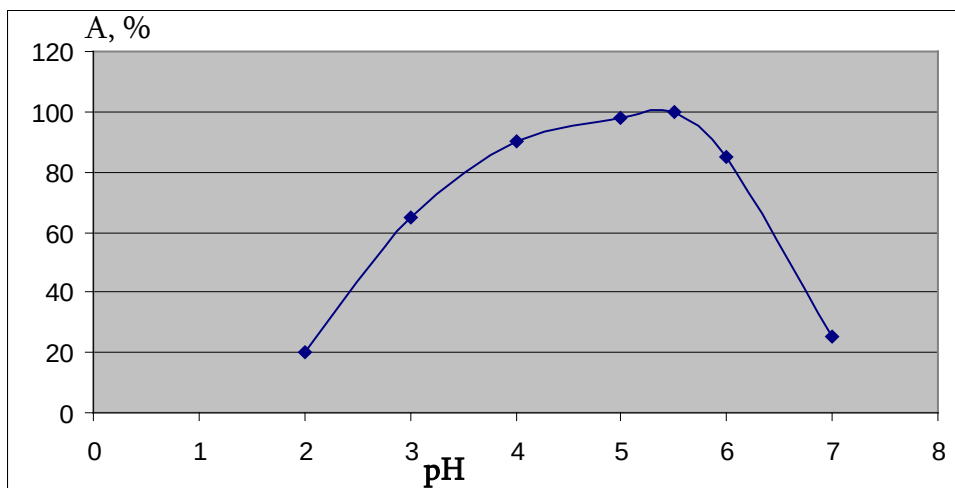
1. *Aspergillus wentii* Z 9-7
2. *Trichoderma viride* I 7-5

სურათი 8. ცელულაზების მოქმედებების ტემპერატურული ოპტიმუმები

4.3 ცელულაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედებების pH ოპტიმუმების დადგენა

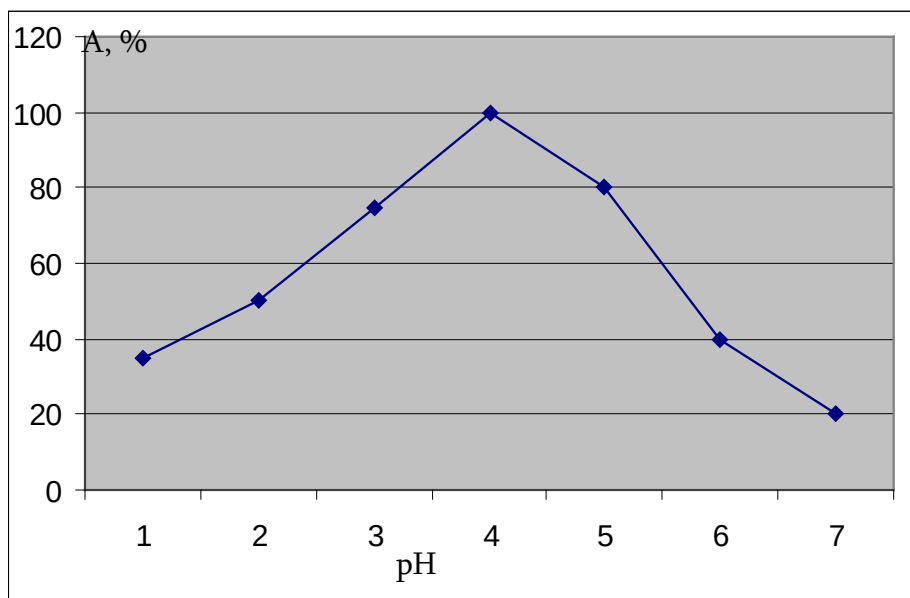
ფერმენტების მოქმედების pH ოპტიმუმების დადგენის მიზნით ფერმენტის საინკუბაციო არის pH იცვლებოდა 2.0-დან 10.0-მდე. შესწავლილი იქნა ორი შტამის

Aspergillus wentii Z 9-7 -ის (ალკალიტოლერანტი) და *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6 -ის მიერ პროდუცირებული ცელულაზური პრეპარატების მოქმედებების pH ოპტიმუმი. ამ კვლევის შედეგები წარმოდგენილია მე-9 სურათზე (ა, ბ). როგორც კვლევის შედეგებმა გვიჩვენა ალკალიტოლერანტი შტამის pH ოპტიმუმი უდრის დაახლოებით 5.8, მაშინ როცა ჩვეულებრივი მეზოფილური (pH-ის მიხედვით) შტამიდან გამოყოფილი ცელულაზას ოპტიმუმი pH 4,0 ფარგლებში მდებარეობს.



ა)

შტამი - *Aspergillus wentii* Z 9-7



ბ)

შტამი - *Sporothrichum pulverulentum* Sj 3-6

სურათი 9. ცელულაზების მოქმედებების მოქმედებების pH ოპტიმუმები

ცელულაზას ფერმენტული პრეპარატებისათვის გამოყენებული ბუფერული ხსნარები:

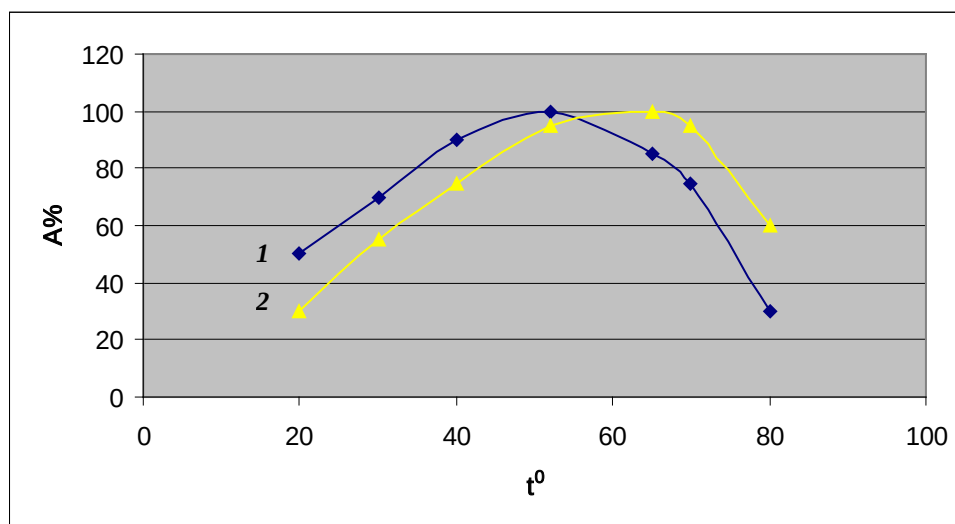
ბუფერული ხსნარები: გლიცინ-HCl-ის ბუფერი 0.05M - pH 2.0-3.5, აცეტატური ბუფერი 0.05M - pH 4.0-6.5, ფოსფატური ბუფერი 0.04M - pH 7.0-9.0; სუბსტრატი ფილტრის ქაღალდი. ინკუბაციის ხანგრძლივობა: 60 წთ. $t^0=50^{\circ}\text{C}$

აღსანიშნავია შტამი – *Aspergillus wentii* Z 9-7, რომლის სიღრმული კულტივირების pH ოპტიუმში 7.5-ის ტოლია, ხოლო მის მიერ პროდუცირებული ფერმენტის მოქმედების pH ოპტიუმში 5.8-ს უდრის. ეს შედეგი კიდევ ერთხელ ადასტურებს ლიტერატურაში არსებულ ინფორმაციებს, რომ აციდოფილური და ალკალიფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH ხშირად არ შეესაბამება საკულტივაციო არის pH-ს ამავე ორგანიზმებიდან გამოყოფილ ფერმენტების მოქმედების ოპტიუმს. [123]

4.4 ქსილანაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედებების ტემპერატურული და pH ოპტიუმების დადგენა

ხშირად დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ცელულაზებისა და ქსილანაზების ერთობლივ მოქმედებას. რაც იმით აიხსნება, რომ სწორედ ამ ფერმენტების ერთობლივი, ხშირად სინერგისტული მოქმედება იწვევს სუბსტრატების ამომწურავ ჰიდროლიზს. ამიტომ ამავე ცდების ფარგლებში ჩატარდა ცელულაზას ფერმენტულ პრეპარატში არსებული ქსილანაზას ფერმენტული აქტივობის შეფასება. ქსილანაზას აქტივობის გაზომვა ტარდებოდა 20°C დან 80°C -მდე ტემპერატურის ინტერვალში. აქტივობები ისაზღვრებოდა სტანდარტული მეთოდით და გამოისახებოდა პროცენტებში. ქსილანაზების ოპტიუმების დადგენისას ფერმენტული პრეპარატები იხსნებოდა Na-ციტრატულ ბუფერში, pH 4, 4. შედარებითი შესწავლის მიზნით შევარჩიეთ გამოყოფილი შტამი- *Penicillium canescence* Sj 41- ქსილანაზას აქტიური პროდუცენტი. საინტერესოა რომ ეს შტამი მეზოფილია და არ წარმოქმნის ცელულაზას. მეორე ქსილანაზას მეწარმე კულტურად გამოვიყენეთ *Aspergillus wentii* Z 9-7 –ის (თერმოფილი) მიერ პროდუცირებული ქსილანაზა.

ტემპერატურული ოპტიუმების დადგენამ გვიჩვენა, რომ თერმოფილი შტამის - *Aspergillus wentii* Z 9-7- ის ქსილანაზა (როგორც ცელულაზას დროს) მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებს 60°C-ზე, მაშინ როცა მეზოფილური შტამის ქსილანაზას ტემპერატურული ოპტიუმი უდრის 50°C (სურათი 10).

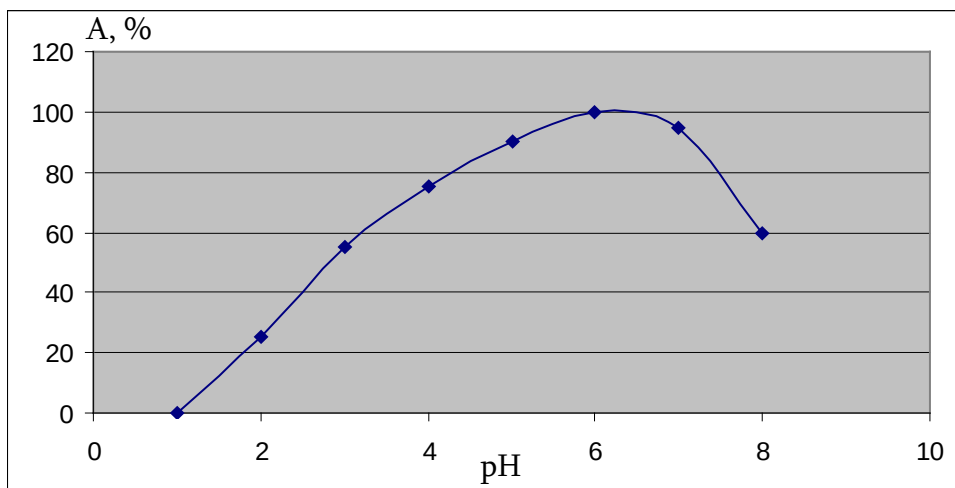


შტამები: 1. *Penicillium canescence* Sj 4-1

2. *Aspergillus wentii* Z 9-7

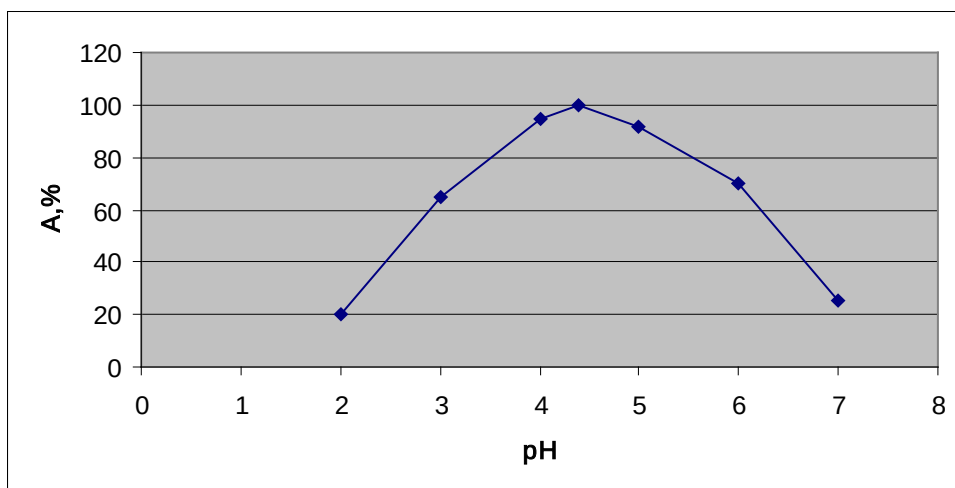
სურათი 10. ქსილანაზების მოქმედებების ტემპერატურული ოპტიუმები

პრაქტიკული მოსაზრებებით ინტერესს წარმოადგენდა იგვე ფერმენტების მოქმედების pH ოპტიუმების გამოვლენა. ამ მიზნით საინკუბაციო არის pH იცვლებოდა 2.0-დან 10.0-მდე. შესწავლილი და დადგენილი იქნა შტამები - *Aspergillus wentii* Z 9-7-ის (ალკალიტოლერანტი) და *Penicillium canescence* Sj 4-1-ის მიერ პროდუცირებული ქსილანაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედებების pH ოპტიუმები. შედეგები ნაჩვენებია მე-11 სურათზე.



ა)

შტამი - *Aspergillus wentii* Z 9-7



ბ)

შტამი - *Penicillium canescence* Sj 4-1

სურათი 11. ქსილანაზების მოქმედების pH ოპტიუმები

როგორც ცდების შედეგებმა ცხადყო ამ ორი შტამის ქსილანაზას მოქმედების ოპტიუმები განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან. თუ *Penicillium canescence* Sj 4-1-ის ქსილანაზა აქტივობის მაქსიმუმს ავლენდა pH 4,4 პირობებში, *Aspergillus wentii* Z 9-7-ის ქსილანაზას მოქმედების მაქსიმუმი შეესაბამებოდა pH 6,2-6,4.

ქსილანაზას ფერმენტული პრეპარატებისათვის გამოყენებული ბუფერული
ხსნარები:

ბუფერული ხსნარები: გლიცინ-HCl-ის ბუფერი 0.05M - pH 2.0-3.5, აცეტატური ბუფერი 0.05M - pH 4.0-6.5, ფოსფატური ბუფერი 0.04M - pH 7.0-9.0; სუბსტრატი ქსილანი. ინკუბაციის ხანგრძლივობა: 60 წთ. $t=50^{\circ}\text{C}$.

ამ შემთხვევაშიც შტამი - *Aspergillus wentii* Z 9-7, რომლის სიღრმული კულტივირების pH ოპტიმუმი 7.5-ის ტოლია, პროდუცირებს ფერმენტს, რომლის მოქმედების pH ოპტიმუმი 6,2-6.4 ს უდრის.

ცელულაზისა და ქსილანაზების აქტიურ პროდუცენტებს – მიკროსკოპულ სოკოებს უნარი შესწევთ გარდაქმნან სოფლის მეურნეობის ნარჩენები და მცენარეში არსებული ქსილანისა და ცელულოზის შემცველი ნივთიერებები არატოქსიკურ, ცილით მდიდარ ბიომასად.

მიღებული ქსილანაზების საშუალებით შესაძლებელია მერქნის სტრუქტურული კომპონენტების დაშლა დაბალმოლეკულურ ნაერთებად, ხოლო იმის გათვალისწინებით, რომ ეს შტამები არ წარმოქმნიან ცელულაზას, შესაძლებელია მათი ეფექტური გამოყენება მაღალხარისხოვანი ქაღალდის წარმოებაში.

4.5. *Penicillium canescence* Sj 4-1 -ის ტექნიკური პრეპარატის

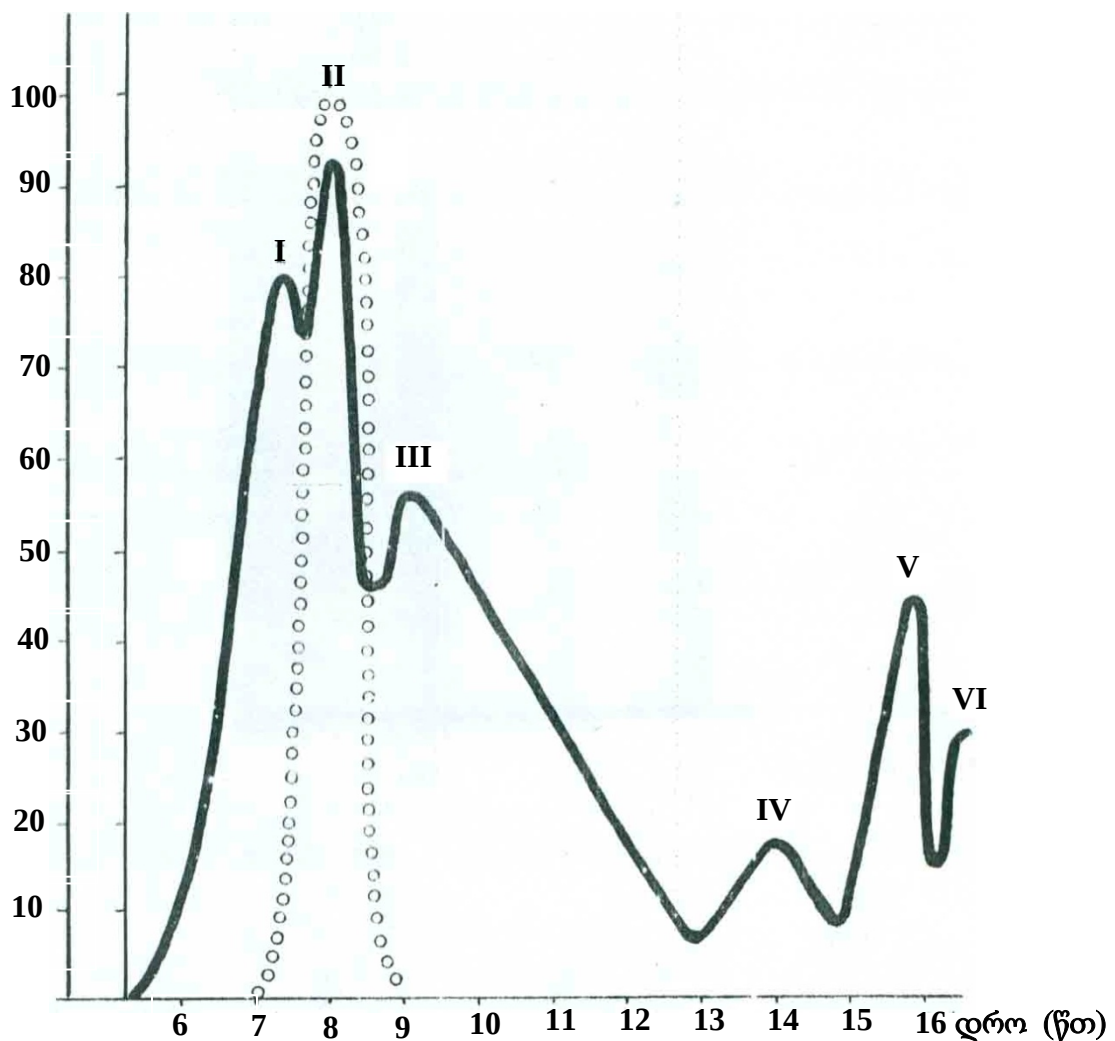
ნაწილობრივი გაწმენდა

სოკოური წარმოშობის ქსილანაზური პრეპარატების მიღების აუცილებლობა აიხსნება იმით, რომ ეს ფერმენტი ფართო გამოყენებას პოულობს სახალხო მეურნეობის სხვადასხვა დარგში: კვების მრეწველობაში, ქაღალდის წარმოებაში, სოფლის მეურნეობაში და ა.შ.

იმის მიხედვით, თუ რა მიზნებისათვის გამოიყენება ფერმენტის პრეპარატი, სხვადასხვა მოთხოვნილებაა მის სისუფთავეზე. მაგალითად, სოფლის მეურნეობაში და ქაღალდის წარმოებაში შეიძლება გამოვიყენოთ კულტურული

სითხის ფილტრატი ან ტექნიკური პრეპარატი, მაშინ როცა კვების მრეწველობაში გამოიყენება უფრო მაღალი სისუფთავის მქონე პრეპარატი.

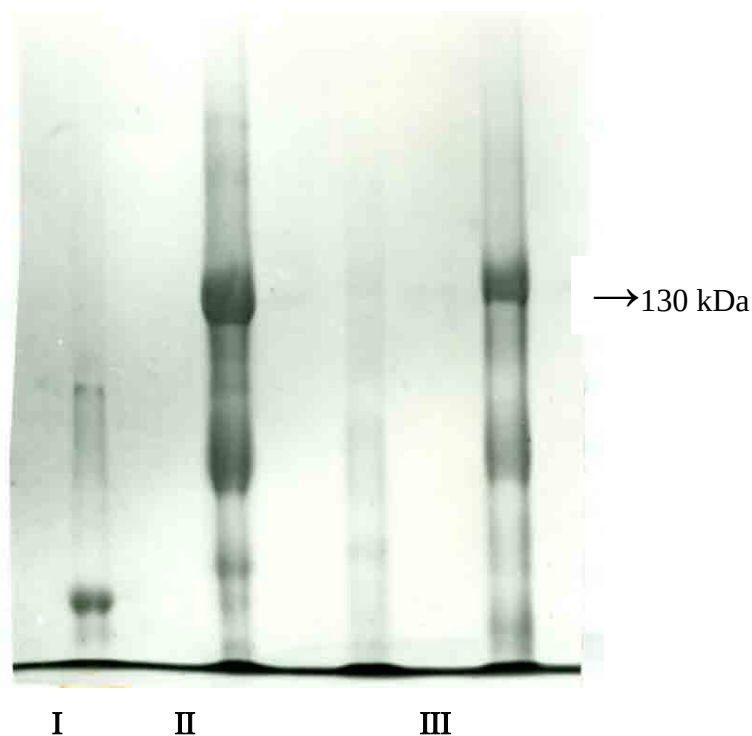
ამიტომ მნიშვნელოვანი იყო მიგველო ქსილანაზის ნაწილობრივ გაწმენდილი პრეპარატი. ამისათვის მოვახდინეთ ტექნიკური პრეპარატის გელ-ფილტრაცია Waters-ის ფირმის Protein PAK-300 sw სვეტზე. ქსილანაზური აქტივობის 85%-ს შეიცავდა მეორე ცილოვანი ფრაქცია. რაც შეეხება შემდეგ I, III, IV, V, VI ფრაქციებს მათში ქსილანაზური აქტივობა კვალის სახითაც არ იქნა აღმოჩენილი (სურათი 12).



სურათი. 12 *Penicillium canescence* Sj 4-1-დან მიღებული ტექნიკური პრეპარატის გელ-ფილტრაცია Protein PAK 300 სწ სვეტზე
II – ქსილანაზური აქტივობის შემცველი ცილა

I, III, IV, V და VI ცილოვანი ფრაქციები ქსილანაზას აქტივობით არ ხასიათდებოდნენ

გელ-ფილტრაციის გამოყენებამ საშუალება მოგვცა 8-ჯერ გაგვეწმინდა ფერმენტი. რაც გამოიხატა აქტივობის მიხედვით 85%-იან გამოსავალში. ფერმენტის გასუფთავების შედეგები შეჯამებულია ცხრილი 13-ში.



სურათი 13. 8%-იანი SDS – დისკ-ელექტროფორეზი

I ბილიკი – მოწმეები:

1 – ალბუმინი – 68000, 2 – პეროქსიდაზა 44000, 3 – ლიზოციმი – 14000.

II ბილიკი – კულტურალური სითხე.

III ბილიკი – ნაწილობრივ გაწმენდილი ფერმენტული პრეპარატი.

ცხრილი 11. *Penicillium canescence* Sj 4-1 - ის ფერმენტ ქსილანაზის გაწმენდის შედეგები

გაწმენდის ეტაპი	ცილა მგ.	ქსილანაზური აქტივობა		გაწმენდის ხარისხი	გამოსავალი %
		საერთო	ხვედრითი		
კულტ. სითხის ფილტრატი	1100	2700	2.5	1	100
დალექვა აცეტონით	473	2457	5.2	2	90
გადალექვა სპირტით	391	2349	6	2.5	87
აღებული აქტივობის 1%					
გელფილტრაცია	0.4	20	49	19.6	74

გელ-ფილტრაციის შედეგად მიღებული ნაწილობრივ გაწმენდილი ფერმენტის ცილოვანი შემადგენლობის დასადგენად გამოვიყენეთ დისკ-ელექტროფორეზი 8% პააგ-ში SDS-ის თანაობისას (სურათი 13)

ამგვარად დამუშავებულია ქსილანაზას ტექნიკური ფერმენტული პრეპარატის მიღების ბიოტექნოლოგია, მიღწეულია ფერმენტის ნაწილობრივი გასუფთავება.

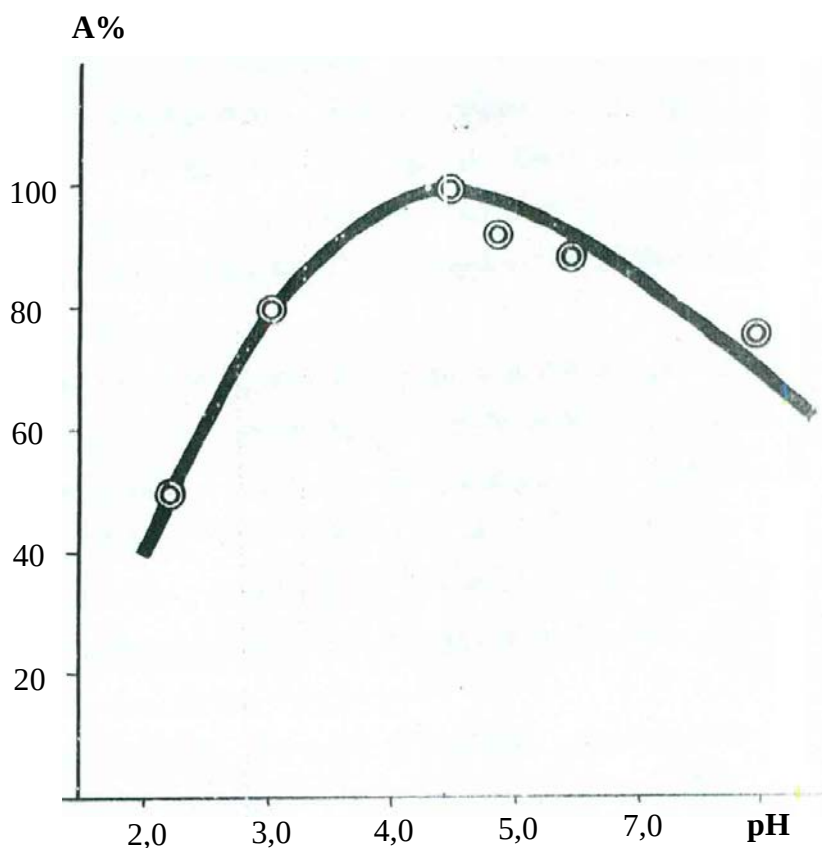
4.6 *Penicillium canescence* Sj 4-1 - ის ნაწილობრივ გაწმენდილი ფერმენტული პრეპარატის ზოგიერთი ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლების დადგენა

4.6.1 pH-ის გავლენა ენდო-1,4 β -D ქსილანაზას აქტივობასა და სტაბილურობაზე

შევისწავლეთ pH-ის გავლენა *Penicillium canescence* Sj 4-1 - დან მიღებული ნაწილობრივ გაწმენდილი ფერმენტ ქსილანაზის აქტივობასა და სტაბილურობაზე.

pH-ის მნიშვნელობა იცვლებოდა 3,1-დან 7,5-მდე. ცდებში ვიყენებდით 0,05 ციტრატულ და 0,05 ფოსფატურ ბუფერს.

ჩატარებული ცდების შედეგად დავადგინეთ, რომ *Penicillium canescence* Sj 4-1 ფერმენტ ქსილანაზის მოქმედების pH ოპტიმუმი 4,4-ის ტოლია. (სურათი 14).

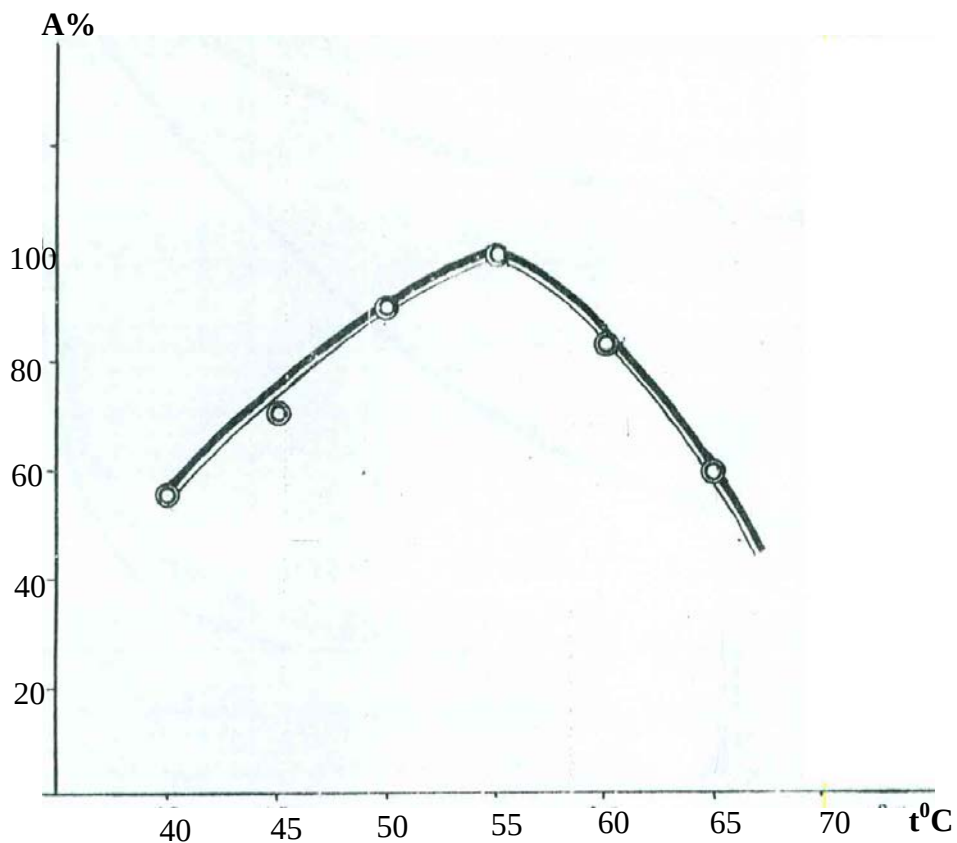


სურათი 14. *P.canescens* RTM-22-ის ქსილანაზას აქტივობის დამოკიდებულება საინკუბაციო არის pH-ზე

4.6.2 ტემპერატურის გავლენა ფერმენტ 1,4-β-D ენდოქსილანაზას აქტივობასა და სტაბილურობაზე

შევისწავლეთ *Penicillium canescence* Sj 4-1-დან მიღებული ფერმენტ ქსილანაზის მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი. ფერმენტის აქტივობას ვსწავლობდით

შემდეგ ტემპერატურებზე: 40⁰, 45⁰, 50⁰, 55⁰, 60⁰, 65⁰. დავადგინეთ, რომ ფერმენტის მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი 55⁰C-ია (სურათი 15).



სურათი 15 *Penicillium canescence* Sj 4-1 -ის ფერმენტ ქსილანაზის ტემპერატურული ოპტიმუმის დადგენა

რაც შეესაბამება სტაბილური ქსილანაზების მოქმედების ტემპერატურულ ოპტიმუმს ლიტერატურულ მონაცემების თანახმად იგი შეესაბამება ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებს [137, 178, 194].

თავი V

თერმოფილური ცელულაზა/ქსილანაზას პრეპარატებით ლიგნოცელულოზური სუბსტრატების ჰიდროლიზი

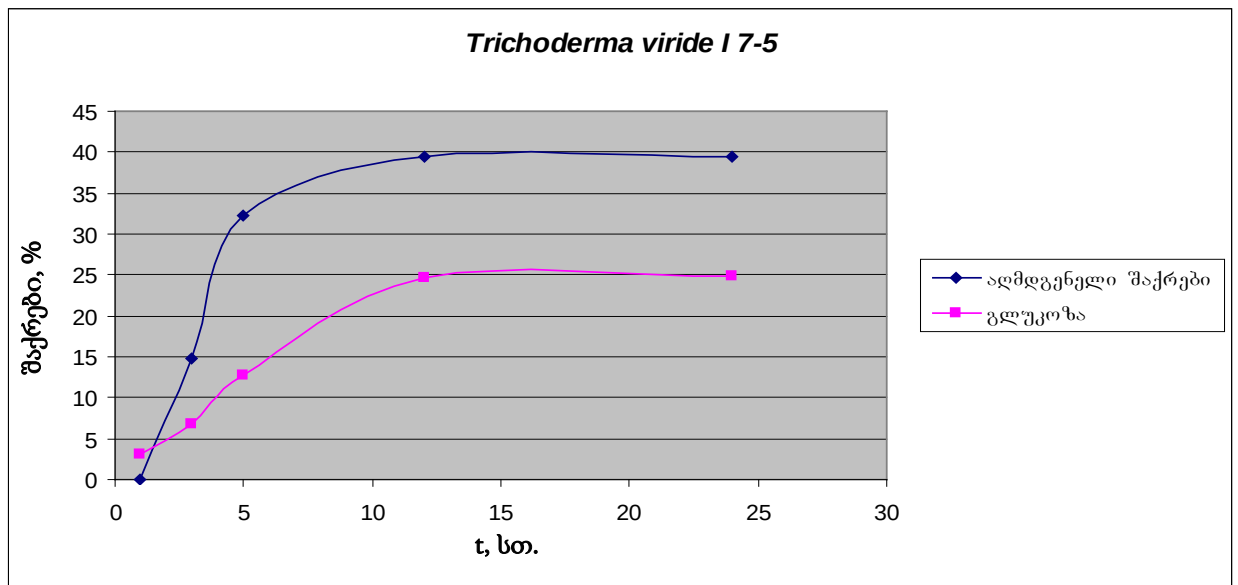
ცელულოზა და ჰემიცელულოზას შემცველი სუბსტრატების დიდი ნაწილი, (მათ შორის აგრარული ნარჩენები) ძირითადად უმაღლესი მცენარეების უჯრედის კედლისგან შედგება, ამიტომ ამ სუბსტრატების ფერმენტული ჰიდროლიზი ცელულოზის და ჰემიცელულოზის დაშლას წარმოადგენს. სოფლის მეურნეობის, კვების პროდუქტების ღირებულების გასაუმჯობესებლად (პოლიმერული სუბსტრატების დასაშლელად, რითაც მათი მონელების პროცესი უმჯობესდება) იყენებენ ქსილანაზებსა და ცელულაზებს. მცენარეული ბიომასის ძირითადი კომპონენტის – ცელულოზას ჰიდროლიზი გლუკოზამდე წარმოადგენს ყველაზე მნიშვნელოვან ტექნოლოგიურ პროცესს, სხვა, არსებულ ფერმენტულ ტექნოლოგიებთან შედარებით. ცელულოზის ჰიდროლიზის ტექნოლოგიებში ცელულაზას სტაბილური ფორმების გამოყენებას აქვს გადამწყვეტი მნიშვნელობა.

ჩვენს მიერ შერჩეული ცელულაზების და ქსილანაზების სტაბილური და აქტიური პრეპარატების გამოყენებით, მასიური წარმოების პროდუქტებში, ერთ-ერთი მთავარი პირობაა ცელულოზური აგრარული ნარჩენების ჰიდროლიზის ეფექტურობის დადგენა.

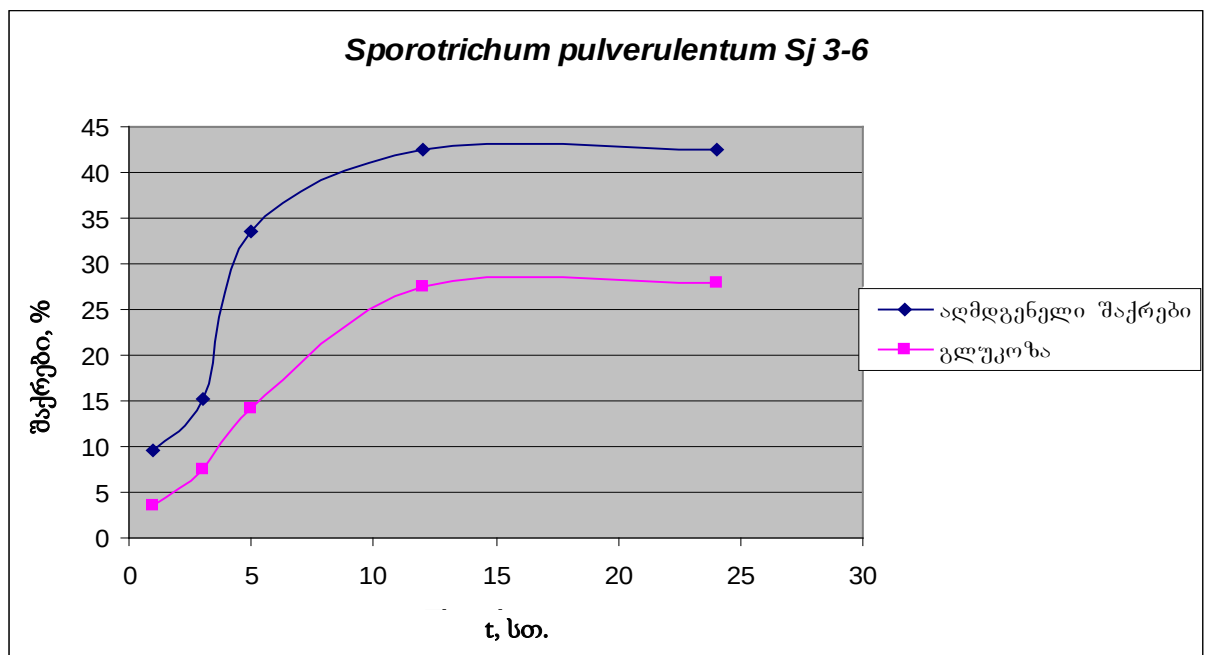
5.1 მცენარეული ნარჩენების ჰიდროლიზი სელექციურად შერჩეული მიკროსკოპული სოკოების ცელულაზებით

შევისწავლეთ დაუმუშავებელი ხორბლის ნამჯის ჰიდროლიზი – *Trichoderma*, *Sporotrichum* და *Aspergillus*–ის გვარის სოკოებიდან მიღებული ცელულაზური პრეპარატებით. ამ სუბსტრატის ფერმენტული ჰიდროლიზი ხორციელდებოდა 0.05M აცეტატური ბუფერით, რომლის pH უდრიდა 4.7, ტემპერატურა 50°C. 1გრ სუბსტრატს ემატებოდა აღნიშნული შტამებიდან მიღებული ცელულაზების პრეპარატის 10 ერთეული ფილტრის ქაღალდის

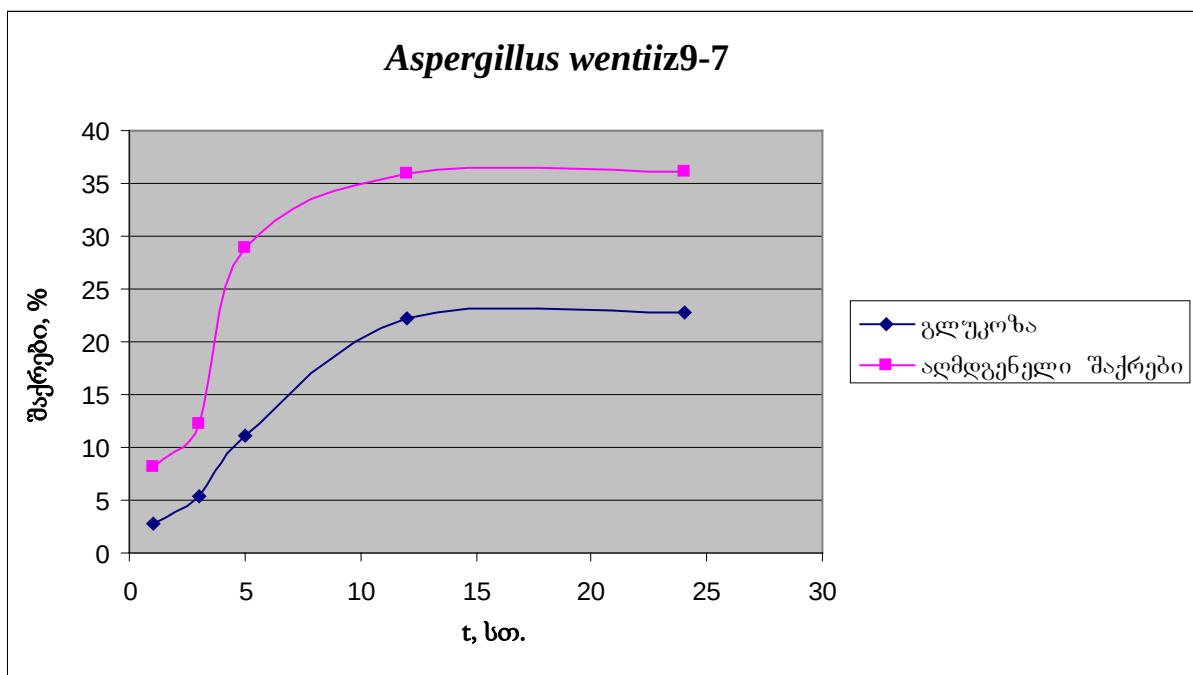
აქტივობის მიხედვით. ამ ცდების შედეგები ნაჩვენებია მე-12 ცხრილში და მე-16 სურათზე. როგორც მიღებული შედეგებიდან ჩანს აღნიშნული ცელულაზური პრეპარატებით ამომწურავი (12 სთ-იანი) ჰიდროლიზის შედეგად სუბსტრატის 36-42% ჰიდროლიზდება აღმდგენელ შაქრებამდე, ხოლო გლუკოზის გამოსავალი შეადგენს 22-27%-ს. შეიძლება ითქვას, რომ ჰიდროლიზის დონე დამაკმაყოფილებელია თუნდაც იმიტომ, რომ საქმე გვაქვს დაუმუშავებელ სუბსტრატებთან. ქვემოთ წარმოდგენილი მრუდები მიუთითებენ ცალკეული შტამების ცელულაზების მოქმედების ეფექტურობას.



ა)



ბ)



ბ)

სურათი 16. ბუნებრივი ნამჯის ჰიდროლიზი შერჩეული შტამების ცელულაზური პრეპარატებით

უნდა აღინიშნოს, რომ ყველა გამოყენებული შტამიდან გამოყოფილი ცელულაზები ახორციელებდნენ დაუმუშავებელი ნამჯის ჰიდროლიზს აღმდგენელ შაქრებამდე არანაკლებ 36-40%, ხოლო იგივე ნარევი გლუკოზის რაოდენობა უტოლდებოდა 25%, რაც ძალიან კარგ მაჩვენებლად უნდა ჩაითვალოს.

ცხრილი 12. დაუმუშავებელი ნამჯის ჰიდროლიზი შერჩეული შტამების ცელულაზებით

შტამი	ჰიდროლიზის დრო (სთ)									
	1 სთ		3 სთ		5 სთ		12 სთ		24 სთ	
	RS%	GI%	RS%	GI%	RS%	GI%	RS%	GI%	RS%	GI%
<i>Sporotrichum pulverulentum</i> Sj 3-6	9.5	3.5	15.3	7.4	33.6	14.2	42.4	27.5	42.5	28.0

<i>Trichoderma viride</i> I 7-5	9.0	3.1	14.7	6.8	32.3	12.7	39.5	24.6	39.5	24.9
<i>Aspergillus wentii</i> Z 9-7	8.2	2.7	12.2	5.3	28.9	11.1	36.0	22.2	36.2	22.7

RS – აღმდგენელი შაქრები

Gl – გლუკოზა

როგორც უკვე ავღნიშნეთ, თანამედროვე ბიოტექნოლოგიის აქტუალური ამოცანაა ლიგნოცელულოზური ნედლეულიდან (მცენარეული ნარჩენები) გლუკოზის მიღება. შესაბამისად პერსპექტიულად ითვლება ამ ამოცანის გადაჭრა ფერმენტული ჰიდროლიზის ბიოტექნოლოგიით. ხოლო წარმოებაში ამ პროცესის რეალიზაციისათვის აუცილებელია ლიგნოცელულოზური ნედლეულის სწორად შერჩევა, აქტიური ცელულოზური კომპლექსის არსებობა და ფერმენტული ჰიდროლიზის ოპტიმალური პირობების დადგენა. აღსანიშნავია ის გარემოება, რომ ამ პროცესებში ძირითადი ფერმენტი არის ცელულაზა, ჰემიცელულაზა კი დამხმარე ფერმენტის როლშია. ეს იმით აიხსნება, რომ ცელულოზის რაოდენობა ლიგნოცელულაზურ მასალაში 60%-ია ან აღემატება ამ მაჩვენებელს და მისი ამომწურავი ჰიდროლიზის პროდუქტი გლუკოზაა. სწორედ ეს მადუღარი შაქარი წარმოადგენს ძირითად ინტერესს. რაც შეეხება ჰემიცელულაზას (ქსილანს) მისი რაოდენობა 25%-ს არ აღემატება, ხოლო მისი ამომწურავი ჰიდროლიზის პროდუქტი პენტოზები არ დუღდება და გლუკოზასთან შედარებით გაცილებით ნაკლებ ინტერესს წარმოადგენენ მრეწველობისათვის.

შედეგების განხილვა

განახლებადი ლიგნოცელულაზა ბუნებაში ყველაზე უფრო გავრცელებულ ორგანულ სუბსტანციას წარმოადგენს. არსებული გაანგარიშებებით [118] ლიგნოცელულოზის ფოტოსინთეზურად ყოველწლიურად განახლებადი რაოდენობა 140-160 მილიარდ ტონას უდრის. ეს იმას ნიშნავს, რომ თუ ამ განახლებადი ბიომასის ნახევარი მაინც გამოყენებული იქნებოდა ენერგეტიკული ან სასურსათო მიზნებით ამ შემთხვევაში პლანეტის ყველანაირი დღეს არსებული ენერგეტიკული და სასურსათო კრიზისი დაბალანსებული იქნებოდა. ლიგნოცელულოზის ძირითად კომპონენტებს წარმოადგენენ ცელულოზა, ჰემიციელულოზა – მაღალმოლეკულური ნახშირწყლებისაგან შემდგარი ბიოპოლიმერები და ფენოლური ტიპის ბიოპოლიმერი-ლიგნინი.

ცელულოზა, ჰემიციელულოზას ჰიდროლიზი შემადგენელ გლუკოზამდე ან პენტოზებამდე შესაძლებელია წარმოებდეს მინერალური მჟავებით ან სპეციალური ამ ბიოპოლიმერების დამშლელი ფერმენტული სისტემით. მინერალური მჟავებით ლიგნოცელულაზური სუბსტრატების დაშლა მონომერებამდე კარგად ცნობილი და ფართოდ გამოყენებული ტექნოლოგიაა. იგი ინტენსიურად გამოიყენებოდა მე-19 საუკუნის დამლევიდან მე-20 საუკუნის ნახევრამდე, რის შემდეგაც ცელულაზური ბიომასის დაშლაზე ახალი მიდგომები იქნა დამუშავებული. ეს მიდგომები მდგომარეობს ბუნებაში არსებულ ამ პოლიმერების დამშლელ ფერმენტულ სისტემის გამოყენებაზე და მათი საშუალებით ცელულოზის ღრმა დეგრადაციაზე. ყველაზე უფრო აქტიური ლიგნოცელულაზის დამშლელნი ორგანიზმები არიან მცენარეებზე ბინადარი მიკროორგანიზმები: მიკროსკოპიული და ბაზიდიალური სოკოები და ბაქტერიები. როგორც ირკვევა, მთელი წარმოქმნილი ცელულოზის 90%-ზე მეტს სწორედ ეს ორგანიზმები გამოიყენებენ. ლიგნოცელულოზის უტილიზაციის პროცესი მიკროორგანიზმების მიერ ძირითადად ნიადაგში მიმდინარეობს, რაც მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს ნიადაგის ნაყოფიერებას და ნახშირბადატომის წრებრუნვას ბუნებაში.

ჩვენს მიერ ჩატარებული სამუშაოს მიზანს წარმოადგენდა ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების ცელულაზას და ქსილანაზას ზღვრული

ტემპერატურული და შესაძლებლობის მიერ კიდურა pH-ის კრიტიკული მნიშვნელობის მქონე ხსნარებში ფერმენტების სტაბილურობის დადგენა. როგორც ჩატარებულმა სამუშაომ გვიჩვენა სელექციურად შერჩეული თერმოფილური კულტურები წარმოქმნიან ცელულაზას, რომლის მოქმედების ოპტიმუმი 10°C აღემატება ცნობილი და დახასიათებული მეზოფილური კულტურების ცელულაზებს. ამავდროულად ტემპერატურული ოპტიმუმის 10 გრადუსით მატება თითქმის უტოლდება პასტერიზაციის ტემპერატურას, რაც პროცესის სტერილურობას უზრუნველყოფს და ცხადია ამას ძალიან დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მრეწველობაში. ჩატარებულმა სამუშაომ ასევე ცხადყო, რომ ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების შერჩევითმა სელექციამ შესაძლებელია მოგვცეს მნიშვნელოვანი შედეგები ფერმენტების სტაბილური ფორმების ძიებაში.

ცილის ქიმიის თვალსაზრისით დიდ ინტერესს წარმოადგენს თერმომედეგი ცელულაზების კინეტიკური და თერმოდინამიკური თავისებურებების შესწავლა და განსაკუთრებით იმის დადგენა, თუ რითი განსხვავდებიან თერმოფილების და მეზოფილების ჰომოლოგიური სტრუქტურის მქონე ცელულაზები ერთმანეთისაგან. უკანასკნელ ხანებში დიდი ყურადღება ექცევა თერმომედეგი ცილების და განსაკუთრებით თერმომედეგი ფერმენტების მოძიებას და შესწავლას. მიღებული შედეგები ცხადყოფენ, რომ თერმომედეგ ფერმენტულ მატრიცებს გააჩნიათ დიდი სამრეწველო პერსპექტივა და მათი მეწარმე ორგანიზმების სელექცია წარმოადგენს თანამედროვე ბიოტექნოლოგიის უმნიშვნელოვანეს მიმართულებას.

მიცელური სოკოები დიდ როლს ასრულებენ ბუნებაში მიმდინარე ნივთიერებათა ცვლის პროცესში. მათი მონაწილეობით ხორციელდება მცენარეული და ცხოველური ნარჩენების დაშლა ხსვადასხვა ორგანული ნაერთების წარმოქმნით. გარდა ამისა, როგორც ეს მრავალჯერ იქნა დამტკიცებული, ამ ტაქსონომიური ჯგუფის მიკროორგანიზმებს, უნარი შესწევთ აწარმოონ მთელი რიგი დაბალმოლეკულური მეტაბოლიტების სინთეზი. აღსანიშნავია მათი სხვადასხვა კლასის ფერმენტების ბიოსინთეზის გამორჩეული უნარი [1, 153]

ამასთანავე, მიცელური სოკოები, როგორც ეუკარიოტული ორგანიზმები, ხასიათდებიან გენეტიკური ინფორმაციის უფრო ფართო გენეტიკური სპექტრით, პროკარიოტებთან (ბაქტერიებთან) შედარებით. სწორედ ამიტომ, როგორც ფართო

გენეტიკური სპექტრის მატარებელი ორგანიზმები, ისინი ხშირად გამოიყენებიან გენურ-ინჟინრული მანიპულაციებში როგორც გენების დონორი ორგანიზმები.

სადისერტაციო ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენს ალპური, სუბალპური, სტეპების, უდაბნოს, ნახევარუდაბნოს, კონტინენტალური და სუბტროპიკული ზონების ბუნებრივი წყაროებიდან (ნიადაგი, მარცვლეული კულტურები, მჟავე და თერმული წყლები), გამოყოფილი მიცელური სოკოების კოლექციის შექმნა, შესწავლა, დახასიათება და სამრეწველო დანიშნულების შტამების შერჩევა. სულ გამოყოფილი და დახასიათებული იქნა 212 შტამი.

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან სულ ცოტა 170.000 მიცელური სოკოს კულტურაა გამოყოფილი და დახასიათებული [35] ამ ტაქსონიმიური ჯგუფის მიკროორგანიზმების არასრული ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიური დახასიათების გამო, სოკოების მხოლოდ რამოდენიმე პროცენტმა ჰპოვა გამოყენება ბიოტექნოლოგიურ პროცესებში, როგორც ეთანოლის, ორგანული და ამინომჟავების, ფერმენტების, ვიტამინების, სამედიცინო პოლისაქარიდების, ნუკლეოტიდების და მთელი რიგი ფიზიოლოგიურად აქტიური ნაერთების სამრეწველო პროდუცენტმა შტამებმა. გამომდინარე იმ ფაქტიდან, რომ სადღეისოდ, ასეპტიკური ფერმენტაციის პროდუქტები დომინირებენ ბიოტექნოლოგიურ ბაზარზე და ალბათ ეს სამარკეტინგო მიმართულება დიდხანს გაგრძელდება, მიცელური სოკოების სელექციას და სტერილურ (სიღრმულ) ფერმენტაციას განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება, როგორც მეცნიერება ტევად ახალ ტექნოლოგიურ მიმართულებას.

სამუშაოს მსვლელობისას მიღებული ფერმენტული პრეპარატების დახასიათებამ და შემოწმებამ დაგვარწმუნა რომ ამ ფერმენტებით წარმოებული ლიგნოცელულოზური სუბსტრატების ჰიდროლიზის სიღრმე სავსებით მისაღებია პრაქტიკული რეალიზაციისათვის.

მომავალში ნავარაუდებია მიღებული ფერმენტული პრეპარატების გასუფთავება ჰომოგენურ მდგომარეობამდე და მათი შედარებითი ანალიზის ჩატარება მიკროსკოპული სოკოების (მეზოფილების, თერმოფილების და ფსიქროფილების) ცელულაზების ჰომოლოგიის დასადგენად.

აგრარული უნივერსიტეტის დურმიშიძის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში შექმნილია ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების უნიკალური კოლექცია, რომელიც მოიცავს საქართველოს ტუტე და დამლაშებული ნიადაგებიდან და რეზერვუარებიდან, მჟავე და თერმული წყლებიდან, სხვადასხვა კლიმატური რეგიონებიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმების კულტურებს. ამ ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების ცელულაზები და ქსილანაზები არ არიან სათანადოდ გამოკვლეული, მათი დეტალური შესწავლა და გამოყენება ტექნოლოგიურ პროცესებში წარმოადგენს მნიშვნელოვან ტექნოლოგიურ და მეცნიერულ სიახლეს.

ბიოტექნოლოგიურ სიახლედ უნდა ჩაითვალოს მთელი რიგი ექსტრემოფილური სოკოების მიერ პროდუცირებულ სტაბილური ფერმენტებით ლიგნოცელულაზური ნარჩენების დეგრადაცია. ეს ტექნოლოგია გულისხმობს სუბსტრატის მულტი-უტილიზაციას და ჰიდროლიზის ორსაფეხურიან პროცესს. საწყის ეტაპზე ხდება აგრარული ნარჩენების შედარებით ადვილად უტილიზირებადი ნაწილის (არსებული ცელულოზა-ჰემიცელულოზის 50%) ჰიდროლიზი ხსნად, დაბალმოლეკულურ შაქრებად. შემდგომ ეტაპზე ლაბორატორიაში ადრე შერჩეული შტამების პირდაპირი კულტივირებით შესაძლებელია სუბსტრატის დარჩენილი ნაწილის კონვერსია ცილით მდიდარ არატოქსიურ ბიომასად. ამგვარად, მიიღწევა სუბსტრატის ცელულოზა-ჰემიცელულოზის საბოლოო უტილიზაცია. აღნიშნული ტექნოლოგიის გამოყენებით აგრარული ნარჩენების კონვერსიის პროდუქტებს წარმოადგენს ცელულაზების და ქსილანაზების ფერმენტული პრეპარატები, ცილით მდიდარი ბიომასა და გლუკოზა, რომელიც არის შუალედური პროდუქტი ეთანოლის და სხვადასხვა ნივთიერების მისაღებად.

დასკვნები:

1. საქართველოს სხვადასხვა ნიადაგობრივ - კლიმატური ზონიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების 212 კულტურიდან შეირჩეულია ცელულაზა/ქსილანაზას 39 და მარტო ქსილანაზას 9 პროდუცენტი. დადგენილია, რომ სხვა შტამებთან შედარებით მაღალი აქტივობით გამოირჩევიან *Aspergillus*, *Penicillium* და *Trichoderma*-ს გვარის ცალკეული წარმომადგენლები. პროდუცენტებს შორის გამოვლენილია პერსპექტული თერმოფილური კულტურები: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus wentii*, *Sporotrichum pulverulentum*, და *Chaetomium thermophile*.
2. გამოვლენილია ცელულაზას აქტიური პროდუცენტები მიკროსკოპული სოკოების თერმოფილურ კულტურებს შორის. სკრინინგის გზით შერჩეულია ცელულაზას აქტიური პროდუცენტი - თერმოფილი *Aspergillus wentii* Z 9-7, *Sporotrichum pulverulentum* Sj 3-6 და მეზოფილი *Trichoderma viride* I 7-5_ სოკოები. დადგენილია, რომ აღნიშნული შტამები არატოქსიური და არაპათოგენურია.
3. სკრინინგის გზით შერჩეულია ქსილანაზას აქტიური პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოს შტამი – *Penicillium canescence* Sj 41, რომელიც მაღალი ქსილანაზური აქტივობის ფონზე ხასიათდება ცელულაზას ნულოვანი აქტივობით. დადგენილია, რომ მრეწველობისათვის ძალზედ საინტერესო ეს შტამი (მაღალი ხარისხის ქაღალდის წარმოება) არატოქსიური და არაპათოგენურია.
4. დადგენილია ცელულაზა/ქსილანაზას აქტიური პროდუცენტი - შტამების ზრდის ოპტიმალური პირობები და საკვები არის შემადგენლობა. ოპტიმალური პირობების დადგენით, საკვები არეების შემადგენელი კომპონენტების ოპტიმიზაციით შტამების მიერ წარმოქმნილი ფერმენტების აქტივობები გაზრდილია 4—დან თითქმის 200%-მდე.
5. დამუშავებულია შერჩეული შტამების ფილტრატებიდან ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატების მიღების მეთოდი. დადგენილია მიღებული

ფერმენტული პრეპარატის ძირითადი ტექნიკური მახასიათებლები: ცელულაზას და ქსილანაზას მოქმედების pH და ტემპერატურული ოპტიმუმები და სტაბილურობა; ნაჩვენებია რომ თერმოფილი შტამების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმები მიიღწევა უფრო მაღალ ტემპერატურაზე (10°C -ით უფრო მაღალ $60-62^{\circ}\text{C}$ პირობებში), მეზოფილურ ანალოგებთან შედარებით.

6. ნაჩვენებია რომ სელექციურად შერჩეული მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა გვარის წარმომადგენელი შტამები: *Aspergillus wentti* Z 9-7, *Sporotrichum pulverulentum* Sj 3-6, და *Trichoderma viride* I 7-5, ახორციელებენ ნამჯის ცელულოზის ჰიდროლიზს აღმდგენელ შაქრებამდე 40%-ით, ხოლო გლუკოზამდე 25%-ით.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. კვესიტაძე გ., კვესიტაძე ე. ბიოტექნოლოგია, თბილისი, შ.პ.ს. „ერტრეტი“ 1999წ.
2. Берестецкий О.А. Об изменении почвенной микрофлоры плодовыми растениями в связи с токсичностью садовых почв. – В кн. Материалы первого межвуз, совещ. по агрофитоценологии. Казань, 1969.
3. Билай В.И., Э.З. Коваль. Аспергиллы. Киев. Наукова думка 1988.
4. Дудка Н.А. и др. Методы экспериментальной микологии. 1982. ст. 439.
5. Жданова Н.Н. Василевская А.И. - Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. Киев Наукова Думка 1982. – 154с.
6. Звягинцев Д.Г. и др. Методы почвенной микробиологии и биохимии из. Моск. Унив. 1980. ст.12.
7. Квачадзе Л.Л., Чхартишвили Д.А., Михлин Э. Д., Квеситадзе Г.И. Влияние состава питательной среды на синтез внеклеточных целлюлаз *Sporotrichum pulverulentum*. Прикл. Биох. Имикробиол. 1985. 5. с.624-629.
8. Квеситадзе Г. И. - Ферменты микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях, Москва «Наука», 141 стр, 1990.
9. Кожемякина О.П., Лосякова Л.С., Федотова Л.М. Получение и хранение продуцента целлюлолитических ферментов. Фермент и спирт. Промышленность. 1985. №3. с.29-31.
10. Курсанов Л.И. - Микология. – М. Гос. Уч. Пед. Изд.-во Нарком проса РСФСР. – 1940. С.-480.
11. Литвинов. Определитель микроскопических почвенных грибов, Ленинград. 1967.
12. Ленгуорси Т. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. С. 322-364.
13. Острикова Н.А., Коновалов С.А. Особенности мутантного штамма *Tricholerna viride* 44. Прикл. Биох. Имикробиол. 1983. 19. №4. с.498-502
14. Панасенко В.Т. // Экология плесневых грибов \Микробиология. 1944.- Т.13, №4.- С.158-170.
15. Пидопличко Н.М., Милько А.А. Атлас мукопальных грибов., Киев, 1971.
16. Спесивцева И.А. Методы определения токсичности кормов \Методы исследования в ветеринарской микологии.-М. Изд.Колос, 1971. с.224-235.
17. Ташпулатов Ж., Джалалова Х., Абдулаев Т., Мирзахимова М. В кн.: Целлюлазы микроорганизмов. М. "Наука". 1981. с.114-124

18. Тунова Н.А., Родионова Н.А., Мартинович Л.И. Ферментативная система *Geotrichum candidum* гидролизующая целлюлозу. Прикл. Биох. Имикробиол. 1980. №16. с. 40-45.
19. Abdel-Hafez, S.I., A.H. Maubasher, and H.M. Abdel-Fattah. 1978. Cellulose decomposing fungi of salt marshes in Egypt. Folia Microbiol. (Praha) 23(1):37-44.
20. Abe Jun-ichi, Bergmann Frederico N., Obeta Kazaeki, Hizikuri Susami, Raw-starch digesting enzymes of *Aspergillus*. Sp. 1985. - Vol. 31, #2. P. 125-135.
21. Adams M.W.W. and Kelly R.M. (1995) Enzymes Isolated from Microorganisms That Grow in Extreme Environments. J. Chemical and Engineering News 73, 32-42 .
22. Andrea A. Stierle *, Donald B. Stierle, and Teri Girtsman Caspase-1 Inhibitors from an Extremophilic Fungus That Target Specific Leukemia Cell Lines. Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, The University of Montana, Missoula, Montana J. Nat. Prod., 2012, 75 (3), pp 344–350)
23. Andrezejczuk-hybel J., Kactowski S. - Condition and course of accumulation and excretion of amylases in cultures of *Aspergillus orizae* //Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol. 1971. – Vol. 19. 15. –313-316. 114. Apdegraff, 1969
24. Aquino A. C. M. M., Jorge J. A., Terenzi H. F., Polizeli M. L. T. M. - Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* - Appli.ume 61, N 4, P. 323 - 328, Date: May 2003.
25. Arja MO, Londesborough J, Joutsjoki V, Lantto R, Vehmaanperä J. 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. Enzyme MicrobeTechnol.34:332-341.
26. Arxvon J.A. The genera of fungi sporulating in pure culture Gramer Lehze, 1970.
27. Atalla RH. 1993. The structures of native celluloses. In: Foundation for biotechnical and industrial fermentation research. Atalla, RH. Ed.; Espoo: Finland. 8: 25-39.
28. Awao T., Otsuka S. (1974). Notes on thermophilic fungi in Japan(3), Trans. Mycol. Soc. Japan.15, 7-22.
29. Badhan AK, Chadha BS, Kaur J, Saini HS. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Mycellobolus* sp. IMI 387099Bioresour. Technol. 2007 Feb;98(3):504-10. Epub 2006 Apr 4.
30. Bajpai P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol Prog.15 :147-157.
31. Barbesgaard PO, Jenson GW, Holm P. 1984. Detergent cellulases.U.S.Patent. No.4,435,307. Novo Industries A/S Denmark.
32. Barnes H. L., and A. W. Rose. 1998. Origins of hydrothermal ores. Science 279:2064-2065.

33. Beardall, J. & Entwisle, L. (1984). Internal pH of the obligate acidophile *Cyanidium caldarium* Geitler (Rhodophyta). *Phycologia* 23, 397-399
34. Beguin P., Aubert J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*,1994. V.13. P 25-58.
35. J.W.Bennett and B.D.Faison, Use of Fungi in Biodegradation. In: Environmental Microbiology, ASM Press, Washington. 2000
36. Bhat KM, McCrae SI, Wood TM. 1989.The endo (1-4)- β -D-glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: isolation, purification and characterization of five major endoglucanase components. *Carbohydr Res.* 190: 279-329.
37. Bhat, M. and Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15:583.620.
38. Bilal Balkan and Figen Ertan - Production and Properties of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* and its Application in Starch Hydrolysis - Preparative Biochemistry & Biotechnology (Taylor & Francis – Turkey); Volume 35, Number 2 / 2005; p 169 – 178
39. Bois, G., A. Bertrand , Y. Piche, M. Fung, and D.P. Khasa. 2005. Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza* 28;;1-11
40. Bowles L.L. - Amylolytic enzymes. *Food Sci. Technol.*, 1996, 75, P.105-129.
41. Brandani da Silva William and Rosane Marina Peralta Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol. 44(5): 493-497 (1998) - Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*
42. Brock, T. D., and J. L. Mosser. 1975. Rate of sulfuric-acid production in Yellowstone National Park. *Geol. Soc. Am. Bull.* 86:194-198.
43. Brock, T. D. (1978). Thermophilic microorganisms and life at high temperatures, pp. 465. Springer-Verlag, New York
44. Brock, T. D., and J. L. Mosser. 1975. Rate of sulfuric-acid production in Yellowstone National Park. *Geol. Soc. Am. Bull.* 86:194-198.
45. Bu'lock J.D., Kristiansen B. 1987 Basic Biotechnology, Academic Press, London.
46. Buchalo, A.S., E. Nevo, S.P Wasser, A. Oren, and H-P. Molitoris 1998. Fungal life in extremely hypersaline water of the Dead Sea: First records. *Proceedings of the Royal Society of London* 265: 1461-1465.
47. Butinar L., P. Zalar, J. C. Frisvad, N. Gunde-Cimerman, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005, 51, 155. doi:10.1016/J.FEMSEC. 2004.08.002.

48. Campos, L., and C. R. Felix. 1995. Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea*. Appl. Environ. Microbiol. 61:2436-2438.
49. Canju RK, Myrthy SK, Vithayathil PJ. Purification and characterization of two cellobiohydrolases from *Chaetomium thermophile* var. coprophile. Biochim Biophys
50. Carvalho, L.M., P.M. Correia, and M.A. Martins-Loucao . 2004. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh. Mycorrhiza 14:165–170.
51. Cavaco-Paulo A., Cortez J., Almeida L. 1998. The effect of cellulase treatment in textile Washing processes. J Soci Dyers and Colour.113: 218-222.
52. Chapman E.S. (1974) Effect of temperature on growth rate of seven thermophilic fuhgi, Mycologia,66,542-546.
53. Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ, Claeysens M, Bhat MK. 1995b. Purification and mode of action of low molecular mass endo-1,4- β -D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. J Biotechnol. 39: 85-93.
54. Collins CM, Murray PG, Denman S. Molecular cloning and expression analysis of two distinct beta-glucosidase genes. Bg 1 and aven 1. With very different biological roles from the thermophilic. Saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. Mycol. Res. 2007 Jul; 111(Pt 7):840-9. Epub 2007 Jun 2.
55. Cooney D. G., and R. Emerson. 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W. H. Freeman and Co., San Francisco, Calif and London.
56. Copeland, R.A. 2000. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Wiley-VCH, Inc.
57. Cronin A.E. and Post F.J. 1977. Reports of a dematiaceous hyphomycete from great salt lake, Utah. Mycologia 69: 846-847
58. Deacon Jim - The Microbial World: - Thermophilic microorganisms; Temperature ranges of microorganisms (The University of Edinburgh)
59. De Palma-Fermamdez ER, Gomes E, da Silva R. Purification and characterization of two beta-glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Folia Microbiol [Praha]. 2002;47(6):685-90
60. Díaz Muñoz Greetchen M. - Fungal Diversity Present at a Hypersaline Environment in Cabo Rojo, Puerto Rico Determined by haracterization of Isolates and Analysis of Environmental - 2006, Roberts M. F., *Saline Systems* 2005, 1, 5. doi:10.1186/1746-1448-1-5
61. Dutta T, Sahoo R, Sengupta R, Ray SS, Bhattacharjee A, Ghosh S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. J Ind Microbiol Biotechnol. 2008 Apr;35(4):275-82. Department of Biochemistry, University

- College of Science, Calcutta University, 35, Ballygunge Circular Road, Kolkata 700 019, West Bengal, India
62. Erikssen J, Goksoyr J. 1977. Cellulases from *Chaetomium thermophile* Var. *dissitutum*. Eur J Biochem. 77: 445-475.
 63. Erikson K.E. – Degradation of cellulase, Experimentia. 1982. V.38, #2. P.156-159.
 64. Eriksson KE, Wood TM. 1985. Biodegradation of cellulose. In: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Higuchi T. Eds. Academic Press New York pp 469-503.
 65. Eriksson KE. 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Biotechnol Bioeng.70: 317-332
 66. Eveleigh DE. 1987. Cellulase: a perspective. Phil Trans R Soc Lond. 321:435-437.
 67. Extremophiles. Special issue of Federation of European Microbiological Societies (FEMS) *Microbiology Reviews* 18, Nos. 2-3; May 1996.
 68. Feller Georges and Charles Gerday –Psychrophilic Enzymes: Hot topics in cold adaptation - Laboratory of Biochemistry, Institute of Chemistry B6, University of Liège, B-4000 Liège-Sart Tilman,Belgium. Correspondence to G.F. December 2003
 69. Fergus, C. L. 1969. The production of amylase by some thermophilic fungi. Mycologia 61:1171-1175.
 70. (Fitch W. M. (1976) J. Mol. Evol. Vol.8, pp. 13-40.
 71. Fitch W. M., Margoliah E. // Science. 1967. Vol. 155. P. 279-284.
 72. Frank M. Dugan. The Identification of Fungi. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. 2006
 73. Galinski E. A., Adv. Microb. Physiol. 1995, 37, 272.
 74. Ganguly R, Mukherjee S. 1995. Effects of different pure and complex carbon and nitrogen sources on production of cellulases by an isolated strain *Penicillium purpurogenum*. J Microb Biotechnol.10: 47-58.
 75. Garbatt J.T. Purification of enzymes. US patent. 1967. M3318782.
 76. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities Pure Appl. Chem., 1987, 59, p.257-268.
 77. Gladden JM, Allgaier M, Miller CS, Hazen TC. Glycoside hydrolase activities of thermophilic bacterial consortia adapted to switchgrass. App. Environ. Microbiol. 2011 Aug. 15;77(16) :5804-12. Epub 2011 Jul.1 Acta 1989 Dec 8;993(2-3):266-74
 78. Gomes I., Gomes J., Gomes D.J., Steiner W. 2000. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Appl Microbiol Biotechnol. 53:461-468.

79. Goyal A, Ghosh B, Eveleigh D. 1991.Characteristics of fungal cellulases. *Bioresour Technol.* 36: 37-50.
80. Grassick A, Murray PG, Thompson R. Three-dimensional structure of a thermostable native cellobiohydrolase. CBH IB. and molecular characterization of the ce17 gene from the filamentous fungus, *Talaromyces emersonii*. *Eur J Biochem.* 2004 Nov;271(22):4495-506.
81. Grigorevski-Lima AL., Da Vinha FN, Souza DT, Bispo AS, Bon EP. *Aspergillus fumigates* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009 May;155(1-3):321-9, Epub 2009 Jan. 6.
82. Gunde-Cimerman N., L. Butinar, S. Sonjak, M. Turk, V. Uršič, P. Zalar, A. Plemenitaš, in *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (Eds N. Gunde-Cimerman, A. Oren, A. Plemenitaš) 2005, p. 397 (Springer: Dordrecht, The Netherlands).
83. Gunde-Cimerman N., P. Zalar, G. S. de Hoog, A. Plemenitaš, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000, 32, 235
84. Guo-ying He. 2007. Effect of cultivating conditions on α -galactosidase production by a novel *Aspergillus foetidus* ZU-GL strain in solid-state fermentation. *J.Zhejiang Univ. Sci* 8: 371-376
85. Gusakov AV, Sinitsyn A P, Berlin AG, Markov A V, Ankudimova NV. 2000. Surface hydrophobic amino acid residue in cellulase molecules as a structural factor responsible for their high Denim washing performance. *Enzyme Microb Technol.*27: 664-671.
86. Haasum, I., Eriksen S. H., Jensen B. and Olsen J. 1991. - Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:656-660.
87. Hanus F. J., Morita R. Y. (1968). Significance of the temperature characteristic of growth, *J. Bacteriol.*, 95,p.736-737.
88. Haska, R, Ohta, Y (1994). *Starch/Starke* 46: 480-485;
89. Hattori Y., Takuchi J. - Studies on amylolytic enzymes produced by *endomyces sp.*Part 111 Hydrolysis of starch and glucosyl saccharides with amyloglucosidase// *Agr. Biol. Chem.* – 1962.-Vol.26, #5.–P.316-322.
90. Hayashida S, Mo K. 1986. Production and characteristics of avicel disintegrating endoglucanase from a protease-negative *Humicola grisea* var. *thermoidea* mutant, *Appl Environ Microbiol.* 51:1041-1046.

91. Hayashida S, Ohta K, Mo K. 1988. Cellulases from *Humicola Insolens*, *Humicola grisea* In: Kellogg and Wood TM. Eds. Methods in Enzymology, Academic Press, London: New York, 160:p 323-332.
92. Hayward TK, Hamilton J, Tholudur A, McMillan D. 2000.Improvements in titer productivity and yield using solka-floc for cellulase production. Appl Biochem Biotechnol. 84-86: 859-887.
93. Heinzelman P, Snow CD, WU I. A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 2009 Apr 7;106(14):5610-5. Epub 2009 Mar 23.
94. Hildebrandt, U., K. Janetta, F. Ouziad, B. Renne, K. Nawrath, and H. Bothe. 2001. Arbuscular micorrhizal colonization of halophytes in central European salt marshes. Micorrhiza 10: 175-183.
95. Hiroyuki H., Heiko T., Toshitaka U., Koichiro S., 1976. Automatic measurements of α -amylase activity during γ -irradiation. Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ. 54. 1, 36.
96. Hochstein L. I., Dalton B., Pollok G. – The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria Identification of galactosic acid as a product of galactose metabolism, 1976. Can. J. Microbiol., v.22 p. 1191-1196
97. Hoog (de Hoog)G. S., E. Gueho, F. Masclaux, A. H. G. Gerrits van den Ende, K. J. Kwon-Chung, M. R. McGinnis, J. Med. Vet. Mycol. 1995, 33, 339.
98. Horikoshi K. Agr. and Biol. Chem.1971. Vol.35.P.1407-1414
99. Horikoshi K. Ibid.1972.Vol.36.P.285-293.
100. Horikoshi Kori, Arita Teruhiko // A new microbial World. Tokyo: Jap. Sci. Soc. Press; B. etc.: Springer, 1982. Vol.12. P. 211.
101. Hoshino E, Susumo I, 1997.Enzymes in detergency. In: Van Ee. JH, Misset O, Baas, EJ Eds., Marcel Dekker, NewYork.149-174.
102. Hua C, Yan Q, Jiang Z. High-level expression of a specific beta-1,3-1,4-glucanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces Thermophila* in *Pichia pastoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010 Sep;88(2):509-18. Epub 2010 Jul 20.
103. Hunter J.C., M. Fonda, L.Sotos,B. Toso, and Belt.1984. Ecological approaches to isolation. Dev.Ind.Microbiol.25,p.247—266
104. Ihara K., S. Watanabe, and T. Tamura. 1997. *Haloarcula argentinensis* sp. nov., and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., Two new extremely halophilic Archaea collected in Argentina. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(1): 73-77.

105. Jeffries TW, Klungness JH, Marguerite S, Cropsey KR. 1994. Comparison of enzyme enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. *Tappi J.* 77: 173-79.
106. Kang M.K., Rhee Y.H. 1995. Carboxymethyl cellulases active and stable at alkaline pH from alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202. *Biotech Lett.* 17: 507-512.
107. Kirk KT, Jeffries TW. 1996. Role of microbial enzymes in pulp and Paper Processing, In: *Enzymes for Pulp and Paper Processing*, ACS symposium Series 655, Ch.1:1-13.
108. Kis-Papo T., A. Oren, S.P. Wasser, and E Nevo. 2003a. Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microb. Ecol.* 45(2): 183-90.
109. Kis-Papo T., V. Kirzhner, S.P. Wasser, E Nevo. 2003. Evolution of genomic diversity and sex at extreme environments: fungal life under hypersaline Dead Sea stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(25):14970-5.
110. Kis-Papo, T., I. Grishkan, A. Oren, S.P. Wasser, and E. Nevo. 2001. Spatiotemporal diversity of filamentous fungi in the hypersaline Dead Sea. *Mycol. Res.* 105, 749-756.
111. Khandke KM, Vithayathil PJ, Murthy SK. Degradation of larchwood xylan by enzymes of a thermophilic fungus, *thermoascus aurantiacus*. *Arch Biochem Biophys.* 1989 Nov 1; 274(2):501-10
112. Kladwang Wipapat, Lene Lange, Nigel Hywel Jones and Amaret Bhumiratana. - Alkaline - tolerant fungi as a source for Alkaline Enzymes, 2002 Mycology Laboratory, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Thailand
113. Kogej Tina, A Cene Gostinčar, A Marc Volkmann, B Anna A. Gorbushina, B and Nina Gunde-Cimerman A, C - Mycosporines in Extremophilic Fungi Novel Complementary Osmolytes? - A University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.; B Geomicrobiology, Institut für Chemie und Biologie des Meeres, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, D-26111 Oldenburg, Germany. - Final version: 24 March 2006.
114. Kreisel H. Grundzuge eines haturlichen systems der pilze Jena; G. Fisher 1969.
115. Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mach RL, Kubicek PEM. 1993. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle from the interior of a secretory fungus. *Enzyme microb Technol.* 15: 90-99
116. Kubicek CP. 1992. The cellulase proteins of *T. reesei*: The structure, multiplicity, mode of action and regulation formation. *Adv Biochem Eng.* 45:1-27.

117. Kumar PKR, Singh A, Schugerl K. 1991. Formation of acetic acid from cellulosic substrates. *Appl Microb Biotechnol.* 34: 570-572.
118. Kvesitadze G., Khatishashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J.J. *Mechanisms of Detoxification: the Basis of Phytoremediation..* Springer Verlag. 241p. 2005 (In Press).
119. Lalluce Cecilia, Bertolini Maria Celina, Ernandes Jpse Roberto, Martini Ann Vaughan, Martini Alessandro // *Appl. And Environ Microciol.* -1988.- Vol. 54, 110.- P.2447-2451.
120. Landwehr M., U. Hildebrandt, P. Wilde, K. Nawrath, T. Toth, B. Biro, and H. Bothe. 2002. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza.*12(4):199-211.
121. Lahav R., P. Fareleira, A. Nejdat, A. Abeliovich, *Microb. Ecol.*2002, 43, 388. doi:10.1007/S00248-002-2001-4.
122. Lee B.H., Blackburn T.H. - Cellulases production by a thermophilic *Clostridium* Species, *Appl. Env. Microbiol*, 1975, 30, #3, p. 346-353.
123. Lengworthy T. Development of microbes under extreme conditions. M. Mir.1981. C. 322-364.
124. Liang C, Xue Y, Fioroni M. Cloning and characterization of a thermostable and halo-tolerant endoglucanase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011 Jan;89(2):315-26. Epub 2010 Aug. 28.
125. Liang Y, Yesuf J, Schmitt S, Bender K. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J Ind Microbiol. Biotechnol.* 2009 Jul;36(7):961-70. Epub 2009 Apr 24.
126. Li YL, Li DC, Teng FC. Purification and characterization of a cellobiohydrolase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2006 Feb;46(1):143-6. Chinese.
127. Li YL, Li H, Li AN, Li DC. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* 2009 Jun;106(6):1867-75. Epub 2009 Feb 23.
128. Liu SA, Li DC, E SJ, Zhang Y. Cloning and expressing of cellulose gene (cbh2) from thermophilic fungi *Chaetomium thermophilum* CT2. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2005 Nov;21(6):892-9. Chinese
129. Lu M, Li D, Zhang C. Purification and properties of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaeromium thermophile*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2002 Aug;42(4):471-7

130. Nakkharat P, Haltrich D. Purification and characterization of an intracellular enzyme with beta-glucosidase and beta-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236. 58. J Biotechnol. 2006 May 29;123(3):304-13. Epub 2006 Jan 30.
131. Nelson N.A. Protometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. – J. Biol. chem. 1944. 153-157.
132. Newhouse, J. R., and B.B Hunter. 1983. Selective media for recovery of *Cylindrocladium* and *Fusarium* species from roots and stems of tree seedings. Mycologia 75:228-233)
133. Maheshwari, R., Bharadwaj, G. and Bhat, M. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 64: p. 461-488.
134. Malloch. Dovid. Moulds, Their Isolation, Cultivation and Identification. University of Toronto Press. Toronto Buffalo London. 1981.
135. Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. In: Gaden, E.L., Mandels, M.H., Reese, E.T. and Spano, L.A. (eds.) Biotechnology and Bioengineering Symposium No 6. John Wiley and Sons, New York. Pp. 21.33.
136. Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. Biotechnol Prog.15: 804-816.
137. Maria L.G.S. and Samia M.T. 2006. Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a “Caatinga” area in the Brazilian state of Bahia. *African. Biotechnol.* 5:1135-1141
138. McHale A, Coughlan MP. 1980. Synergistic hydrolysis of cellulose by components of extracellular cellulase system of *Talaromyces emersonii*, FEBS Lett. 117:319-322.
139. McCarthy T, Tuohy MG. A multi-step chromatographic strategy to purify three fungal endo- β -glucanases. Methods Mol. Biol. 2011; 681:497-524.
140. Montalvo-Rodríguez, R., R.H. Vreeland, A. Oren, M. Kessel, C. Betancourt, and J. López-Garriga, 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. Int. J. Syst. Bact. 48: 1305-1312
141. Montalvo-Rodríguez, R., J. López-Garriga, R.H. Vreeland, A. Oren, A. Ventosa, and M. Kamekura. 2000. *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. Int. J. Syst. Bacteriol. 50: 1065-1071
142. Montenecourt B S.1983. *Trichoderma reesei* cellulases. Trends Biotechnol.1: 156-161.
143. Mouchacca, J. 1997. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. Cryptogam. Mycol. 18:19-69.

144. Murashima, K., Moriya, T., Hamaya, T., Koga, J., Sumida, N., Aoyagi, K., Murakami, T and Kono, T. 2000. Enzyme endoglucanase and cellulase preparations containing the same. Pat. US 6,159,720.
145. Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T. and Kono, T. 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 30:319-326.
146. Murray P, Aro N, Collins C, Grassick A. Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 beta-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expr Purif.* 2004 Dec;38(2):248-57.
147. Ng IS, Li CW, Chan SP, Chir JL, Chen PT, Tong CG. High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresour. Technol.* 2010 Feb;101(4):1310-7. Epub 2009 Oct. 17.
148. Nieves-Rivera, A. 2005. Coastal Mycology of Puerto Rico: A Survey and Biological Aspects of Marine, Estuarine, and Mangrove Fungi. Doctoral dissertation. University of Puerto Rico, Mayagüez Campus.
149. Noack, K. 1920. Der Betriebstoffwechsel der thermophilen Pilze. *Jahrb. Wiss. Bot.* 59:593-648.
150. Ohga M., Shimizu K., Morita Y.//*Agric.Biol.Chem.* 1966.V.30.P.967.
151. Petrovič, U., N. Gunde-Cimerman, and A Plemenitas,. 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molec. Microbiol.* 45(3): 665-672.
152. Prista, C., A. Almagro , M.C. Loureiro-Dias, and J. Ramos. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10):4005-9.
153. Ramesh. Maheshwari, Girish Bharadwaj. and Mahalingeshwara K.Bhat., *Fungi: Their Physiology and Enzymes. Journal of Microbiology and Molecular Biology*, (2000).
154. Rao DV, Shivannavar CT, Gaddad SM - Bioleaching of copper from chalcopyrite ore by fungi - Department of Studies and Research in Microbiology, Gulbarga University, Gulbarga 585 106, India. - *Indian J Exp Biol.* 2002; 40(3):319-24 (ISSN: 0019-5189);
155. Rath Chandi C. - Thermophiles : A novel group of microorganisms for 21st century - Centre for Post Graduate studies in Microbiology, OUAT, Bhubaneswar, India-75 2003
156. Rath, C. C. and Subramanyam , V. R. (1997). A note on thermotolerant cellulolytic fungi from a hot spring at Taptapani, Orissa, *Microbios.* 89 : 157-161.

157. Regina S. Redman, Anastassia Litvintseva, Kathy B. Sheehan, Joan M. Henson, and Rusty J. Rodriguez - Fungi from Geothermal Soils in Yellowstone National Park - Applied and Environmental Microbiology, December 1999, p. 5193-5197, Vol. 65, No. 12
158. Roberts Dave - Eukaryotes in extreme environments - (5 February 1998), Zoology Department.
159. Roberts M. F., *Saline Systems* 2005, 1, 5. doi:10.1186/1746-1448-1-5.
160. Roy SK, Dey SK, Raha SK, Chakrabarty SL. 1990. Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). J Gen Microbiol. 136:1967-1971.
161. Ruiz-Suárez, J. 2004. Areniculus filamentous fungi in Mayagüez Bay shoreline, Western Puerto Rico. Master Thesis. University of Puerto Rico, Mayagüez Campus.
162. Ryu DDY, Mandels M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. Enzyme Microb Technol. 2: 91-102.
163. Sadhukhan, R., S. K. Roy, S. K. Raha, S. Manna, and S. L. Chakrabarty. 1992. Induction and regulation of α -amylase synthesis in a cellulolytic thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104). Indian J. Exp. Biol. 30:482-486.
164. Schleper, C., Pühler, G., Kühlmorgen, B. & Zillig, W. (1995). Life at extremely low pH. Nature 375, 741-742
165. Schüle M, Tikhimirov DF, Schou C. 1993. *Humicola insolens* alkaline cellulases. Proc. of second Tricel Symposium on *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. 8: 109-116.
166. Schüle M. 1997. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. J Biotechnol. 57:71-81
167. Sen Sribitr., Abraham T.K., Chakrabarty S.L. - Characteristics of the cellulase produced by *Myceliophthora thermophila* D-14. Can. J. Microbiol. 1982. 28. #3, p. 271-177.
168. Singh J, Batra N, Sobti RC. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004 Feb; 31(2):51-6. Epub 2004 Jan 31.
169. Solomon P. Wasser, 2011. Biodiversity and Taxonomy of Fungi, p.5-20
170. Somogyi M. Determination of reducing sugars. – J. Biol. Chem., 1952, 195, 199-28
171. Starkey R. L., Waksman S. A. // J. Bacteriol. 1943. Vol. 45. P. 509-519
172. STCU project #P-196, Microbial Diversity for Novel Biotechnology Applications
173. Stetter, K. O. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett. 452:22-25.

174. Taber R. A., Pettit R.E. (1975). Occurrence of thermophilic microorganisms in peanuts and peanut soil, *Mycologia*, 67, 157-161.
175. Takeichi y., Ohmure K., Nakayama A. et al. // Ibrid. - 1983. – Vol. n 47, 11. – PP. 159-161.
176. Tansey M. R. (1972) Effect of temperature on growth rate and development of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile*, *Mycologia*, 64, 1290-1299.
177. Teeri TT. 1997. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *TIBTECH*. 15:160-167.
178. Venkatesh Kavya and Tallapragada Padmavath. 2009. Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Polish j. of Microbiology*, Vol. 58. No 2. 125-130.
179. Vyas S, Lachke A, Ahmad A. 2003. Fungal cellulases for novel industrial applications. In: Rao GP, Manoharachari C, Bhat DJ, Rajak RC, Lakhanpal TN Eds. *Frontiers of Fungal Diversity in India*. Lucknow: International Book Distributing Co., 143-159.
180. Vyas S, Lachke A 2003. Biodeinking of Mixed Office Waste Papers by alkaline active cellulases from alkalotolerant *Fusarium* Sp. *Enzyme Microb Technol*. 2: 236-245.
181. Vyas Santos R. - Characterization of Alkali stable Fungal Cellulases and their Potetial Industrial - Applications, a thesis submitted to the University of pune for for the degree of Doctor of Philosopy in Biochemical Scienes National Chemikal Laboratory Pune - 411 008. May, 2004.
182. Vyas S, Lachke A. 2004. Enzymes for Pulp and Paper manufacturing: Towards Catalyzing Sustainable Development. In: *Green Chemistry and Sustainable Development*. Dr. M.M. Srivatsva Eds. Allied publishers, New Delhi.
183. Warcup S.H. The soil-plate method for isolation of fungi from soil-Nature, 1950, 166, #4502, p. 117.
184. Waksman S.A. Soil fungi and their activities. – *Soil., Sci* 1916, 2, #1, p. 103-105.
185. Wheals AE, Basso LC, Denise MG, Amorim HV. 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnol*. 17: 482-487.
186. Whitaker, R. H. 1975. *Communities and ecosystems*. MacMillan Publishing Co., New York, N.Y.
187. William Brandani da Silva and Rosane Marina Peralta Can. *J. Microbiol./Rev. can. microbiol*. 44(5): 493-497 (1998) - Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*
188. Williams DM and Embley TM (1996). *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 569-595.

- 189.** Wood TM, McCrae SI. 1982. Purification and some properties of a (1,4)- β -D-glucan glucohydrolase associated with the fungus *P. funiculosum*. Carbohydr Res. 110: 291-303.
- 190.** Wood TM. 1992a. Microbial enzymes involved in degradation of cellulose component of plant cell wall, In: Rowett Research Institute Annual Report, p 10-24.
- 191.** Wood TM. 1992b. Fungal cellulases. Biochem Soc Trans. 20: 46-53.
- 192.** Zalar P., G. S. de Hoog, H. J. Schroers, J. M. Frank, N. Gunde-Cimerman, *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005, 87, 311. doi:10.1007/S10482-004-6783-X.).
- 193.** Zanoelo FF, Polizeli Mde L, Terenzi HF, Jonge JA. β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium* is stimulated by glucose and xylose. FEMS Microbiol Lett. 2004 Nov 15;240(2):137-43.
- 194.** Zhang S, Zhang K, Chen X. Five mutationd in N-terminus confers thermostability on mesophilic xylanase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 Apr 30;395(2):200-6. Epub 2010 Mar 31.
- 195.** Zhou J.,Zhang R., Yao B., A thermphilic cellulase complex from *Phialophora* sp. showing high capacity in cellulose hydrolysis. Appl. Biochem. Biotechnol. 166,952-960, 2011
- 196.** Zhu J. K., *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001, 4, 401. doi:10.1016/S1369-5266(00)00192-8).