

СЕЛЕКЦІЯ АНАЕРОБНОГО ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНОГО ТЕРМОФІЛЬНОГО ШТАМУ *Clostridium thermocellum* 5СТ

Л. С. Ястремська
О. А. Васильченко

Національний авіаційний університет,
Інститут екологічної безпеки, Київ

E-mail: lorarem@gmail.com

Проведено селекцію анаеробного термофільного целюлолітичного штаму *Clostridium thermocellum* 5СТ багаторазовими пересіваннями та дією зростаючих концентрацій екзогенних хімічних сполук. Ріст культури оцінювали за утворенням біомаси, накопиченням кінцевих продуктів метаболізму та інтенсивності гідролізу целюлози. Отримана культура *Clostridium thermocellum* 5СТ резистентна до етанолу в концентрації 2%. Показано, що уведення водню в культуральне середовище до концентрації 100% об. не інгібує росту культури, призводить до підвищення утворення етанолу в 2 рази та зниження утворення ацетату в 2,5 рази. Уведення ацетату натрію в малих концентраціях також не пригнічує росту культури, тоді як 50% об. у середовищі суттєво інгібує його; гідроліз целюлози в цьому разі знижується в 1,5 рази.

Селекціонований анаеробний целюлолітичний термофільний штам *C. thermocellum* 5СТ може використовуватись у біотехнологічних процесах для одержання перспективних енергоносіїв та термостабільних ензимів.

Ключові слова: анаеробні термофільні целюлолітичні бактерії, *Clostridium thermocellum*, збродування целюлози.

Високоспеціалізовані анаеробні спороутворювальні бактерії роду *Clostridium* є дуже цінними для сучасної біотехнології [1]. Серед продуктів метаболізму цих організмів є перспективні енергоносії (водень, етанол), органічні кислоти (ацетат, пропіонат, бутират), технологічно важливі ензими (целюлази, геміцелюлази, пектинази тощо). Пошук нових природних штамів, селекція мутантів, одночасне культивування декількох мікроорганізмів дають змогу одержати більший вихід енергоносіїв і корисних продуктів.

Особливу увагу привертають зараз термофільні представники цієї групи бактерій [2, 3], які мають порівняно з аналогічними аеробними мікроорганізмами більшу інтенсивність метаболічних процесів, меншу в'язкість культуральних розчинів і, відповідно, більшу розчинність субстрату, внаслідок чого полегшується проведення технологічних процесів, а вартість продуктів ферментації істотно здешевлюється.

Виділено індуковані ультрафіолетом аукотрофні мутанти *C. thermocellum* з більшою активністю ендо- і екзоглюконаз [4]. Збільшення целюлазної активності водночас супроводжувалося збільшенням здатності мутантного штаму гідролізувати ксилан. За

допомогою багаторазових пересівань бактерій *C. thermocellum* на середовище зі зростаючими концентраціями етанолу [5, 6] вдалось одержати культуру, резистентну до етанолу в концентрації вище 5%. Штам зберігав здатність рости при 60 °С за присутності 25 г/л етанолу, тимчасом як підвищення концентрації етанолу до цього рівня в середовищі культивування дикого штаму призводило до зниження оптимальної температури росту [7]. За допомогою γ -радіації отримано штами *C. thermocellum*, резистентні до 2,5% -го етанолу в середовищі [8]. Під час культивування продуцента в умовах контролю рН у ферментері вдається одержувати етанол у кількості 6 г/л. Зі зміною середовища культивування мутантні штами гідролізують целюлозу, що міститься в культуральній рідині в концентрації 5–6 г/л, при цьому вихід етанолу досягає 12–14,5 г/л [8].

Поліпшення культуральних ознак целюлолітичних бактерій також можливе за їх спільного культивування з бактеріями інших видів [9]. Спільне культивування у разі добре підібраних партнерів дає змогу збільшити швидкість і глибину гідролізу субстратів, прискорити біосинтез ензимів і збільшити їхню активність, значно підвищити швидкість утворення метаболітів.

Отже, такі важливі властивості термофільних бактерій, як оптимум температури, термо-стабільність целюлазного ензимного комплексу, здатність до ферментування пентоз можна поліпшити в результаті пошуку нових природних штамів бактерій [10].

До сьогодні проведено достатньо детальні дослідження, що висвітлюють окремі сторони фізіолого-біохімічних, морфологічних властивостей целюлолітичних мікроорганізмів, їх таксономії. Водночас селекція чистих термофільних спороутворювальних целюлолітичних анаеробів, їхні фізіологічні та біохімічні характеристики ще недостатньо з'ясовано у зв'язку зі складнощами їх виділення і культивування.

Метою роботи є селекція анаеробного целюлолітичного термофільного штаму *C. thermocellum* 5СТ та дослідження його резистентності до екзогенних хімічних сполук для використання в біотехнологічних процесах.

Матеріали і методи

Предметом дослідження був анаеробний целюлолітичний термофільний штам *C. thermocellum* 5СТ, ізольований з активного мулу метантенка станції біологічного очищення стічних вод (м. Київ, Бортничі) [11].

Для культивування штаму використовували мінеральне середовище «Р» такого складу (г/л):

K_2HPO_4 — 0,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 0,4; NH_4Cl — 1,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,02; NaHCO_3 — 1,0; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; 0,2% -й розчин індикатора резазурину — 1 мл; розчин мікроелементів — 1 мл/л; розчин вітамінів — 1 мл/л; вода дистильована — 1 л; рН середовища 7,0–7,5. Автоклавували при 1,5 атм [11]. Як джерело вуглецю застосовували целюлозу (фільтрувальний папір) — 1% об., целюлозу (0,5%).

Розчини вітамінів, вуглеводів стерилізували фільтруванням через фільтри «Синпор» № 8, 9, зберігали окремо в анаеробних умовах і вносили стерильно в середовище культивування шприцом безпосередньо перед посівом [12]. Окремо готували робочий розчин індикатора резазурину та розчини відновників [12].

Середовище розливали анаеробно в культиватор об'ємом 500 мл зі штуцерами, в які вставляли вимірювальні електроди для визначення рН [13]. Для дегазації середовища використовували інертний газ аргон (ДСТУ 10157–79), що містить O_2 у концентрації не вище 0,0007%. Водень одержували в апараті СГС-2 електрохімічним розкладанням 25%-го розчину КОН [14].

Ацетат натрію, етанол і водень вводили в культиватор анаеробно шприцом в стерильних умовах в експоненційній фазі росту культури.

Ріст целюлолітичних бактерій оцінювали за величиною оптичної густини клітинної суспензії, яку визначали на фотоелектрокалориметрі ФЕК-56П за $\lambda = 540$ нм у кюветі 0,5 см, візуально — за ступенем руйнування целюлози (фільтрувального паперу) і гравіметрично [14], а також за виділенням газів — H_2 , CO_2 . Склад газів аналізували на хроматографі ЛХМ-8МД. Для визначення водню та азоту використовували сталеву колонку 1,5 м, діаметром 3 мм, заповнену молекулярними ситами 5А, фракції 0,25, для визначення CO_2 — сталеву колонку 2,5 м, діаметром 3 мм, заповнену полісорбом-1. Температура колонок 30 °С, газ-носій — аргон, швидкість потоку — 30 мл/хв, детектор — катарометр, струм детектора — 100 мА. Проби газової фази відбирали шприцом, об'єм уведеної проби — 0,5 мл.

Кислоти і спирти визначали на хроматографі Chrom-5. Для визначення ацетату, етанолу й лактату застосовували скляну колонку завдовжки 2,4 м, діаметром 3 мм, заповнену носієм паропаком-Q. Температура колонок –190 °С, випарника — 220 °С, детектора — 200 °С. Газ-носій — гелій, швидкість потоку — 30 мл/хв, детектор — полум'яно-іонізаційний, струм детектора — 150 мА. Проби центрифугували за 10 000 г упродовж 20 хв, кислоти і спирти визначали в супернатанті. Об'єм проб — 5–10 мкл.

Результати та обговорення

Анаеробний термофільний целюлолітичний штам *C. thermocellum* 5СТ культивували на целюлозі та целобіозі як основних субстратах. Штам гідролізував органічні речовини з утворенням метаболітів — етанолу, ацетату, лактату, водню, вуглекислоти. Приріст біомаси спостерігався через 12 год культивування. Ацетату накопичувалось у 2 рази більше, ніж етанолу (табл.).

У разі культивування на целюлозі целюлолітична активність штаму збільшувалась під час періодичних пересівань від'ємно-доливним способом за рН не нижче 6,5 і залежала від кількості субстрату та часу культивування (рис. 1, а). Зі внесенням у середовище 1% об. целюлози спостерігали майже повний її гідроліз (80–100% об.), за концентрації 2–3% не утилізованими залишаються 50–60% об. її кількості. Періодичними пересіваннями (п'ять — шість) можна скоротити час розкладання целюлози до 2–3 діб (рис. 1, б).

Утворення метаболітів під час культивування *C. thermocellum* 5СТ на середовищі з целобіозою

Час росту, год	Оптична густина, D _{540нм}	H ₂	CO ₂	Етанол	Ацетат	Лактат	Питома швидкість росту μ, год ⁻¹
		ммоль/л					
0	0,05±0,001	0	0	0	0	0	0
12	0,10±0,003	3,0±0,01	2,50±0,01	8,75±0,01	25,5±0,01	0,15±0,03	0,057±0,001
24	0,28±0,001	6,2±0,01	3,85±0,01	16,9±0,01	35,6±0,01	2,0±0,01	0,086±0,00
48	0,30±0,001	6,2±0,01	3,80±0,02	17,0±0,01	35,6±0,01	2,0±0,01	0,003±0,00
72	0,30±0,001	6,3±0,02	3,80±0,02	17,0±0,01	35,6±0,01	2,0±0,01	0,003±0,00

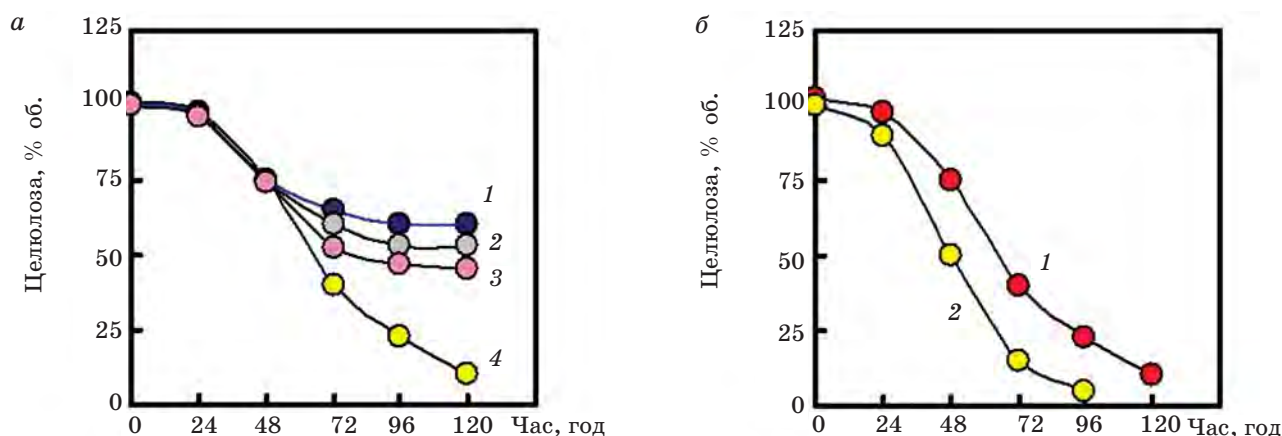


Рис. 1. Розклад целюлози штамом 5СТ залежно: а — від її концентрації в середовищі (% об.): 1 — 4,0; 2 — 3,0; 3 — 2,0; 4 — 1,0; б — від періодичних пересівів: 1 — 1-2 пересіви; 2 — 5-6 пересівів

Отриманий селекціонований штам *C. thermocellum* 5СТ використовували для спільного культивування з різними видами бактерій: сахаролітичним *C. thermosaccharolyticum* 1S та метаногенними археями *Methanobacterium* sp.13M, *Methanosarcina* sp.84 MS [15]. Це підвищило вихід етанолу, водню і метану в два рази.

Для дослідження резистентності селекціонованого штаму *C. thermocellum* 5СТ до екзогенних хімічних сполук в дегазоване живильне середовище з целобіозою як джерелом енергії вносили зростаючі концентрації водню, ацетату натрію та етанолу і визначали їх вплив на накопичення біомаси й утворення основних метаболітів.

В експоненційній фазі росту культури (10–12 год) у газову фазу культиватора вводили: 1) водень у концентрації від 30 до 100% об.; 2) ацетат натрію в концентрації 0,1–50%; 3) етанол у концентрації 0,1–3,0% об.

Водень — один з основних метаболітів, що накопичується у процесі трансформації органічних речовин целюлолітичними культурами. Утворення молекулярного водню відбувається в результаті окиснення пірувату за участю піруват:ферредоксин-оксидоредуктази; пригнічення утворення водню може призвести до зупинки розвитку культури [16].

Вплив водню. Показано, що зі зростанням концентрації водню в газовій фазі спостерігається збільшення лаг-фази росту культури до 18–24 год, підвищення утворення етанолу в 2 рази (до 38,9 ммоль/л) і зниження в 2,5 раза кількості ацетату (до 20,0 ммоль/л) (рис. 2).

Екзогенно введений водень не пригнічує утворення біомаси целюлолітичного штаму 5СТ (рис. 3). За надлишку H₂ у середовищі може відбуватися відновлення НАДФ, що блокує реакції ензиматичного окиснення в клітині.

Вплив ацетату. Встановлено, що внесення ацетату в кількості 0,1–0,5% не пригнічує гідроліз целюлози і утворення водню штамом 5СТ. Унесення 50% ацетату натрію знижує гідроліз целюлози й утворення водню в 1,5 раза (рис. 4).

Вплив етанолу. Показано, що внесення етанолу в концентрації від 0,1 до 0,5% об. призводить до зростання тривалості лаг-фази росту до 26 год. Внесення 1,0% об. етанолу збільшує лаг-фазу до 50 год і майже не впливає на ріст. Концентрація етанолу, вища за 2,0% об., спричинювала пригнічення росту культури й значне подовження лаг-фази (до 72 год) (рис. 5).

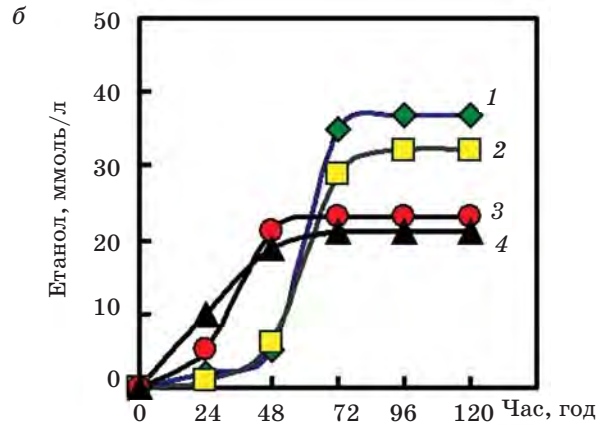
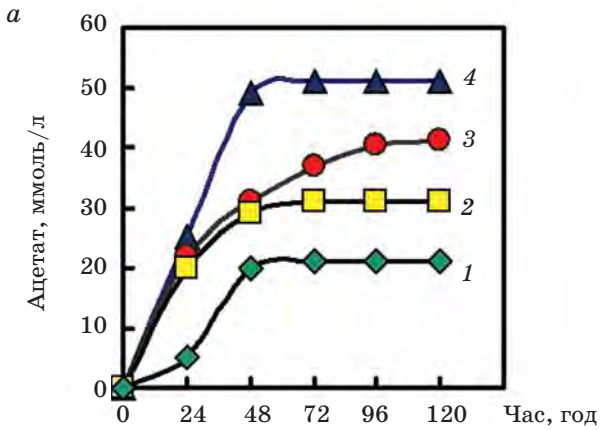


Рис. 2. Вплив екзогенного водню на утворення ацетату (а) та етанолу (б) штамом *C. thermocellum* 5СТ на середовищі з целюлозою.

Концентрація водню (% об.): 1 — 100; 2 — 50; 3 — 30; 4 — без уведення водню (контроль)

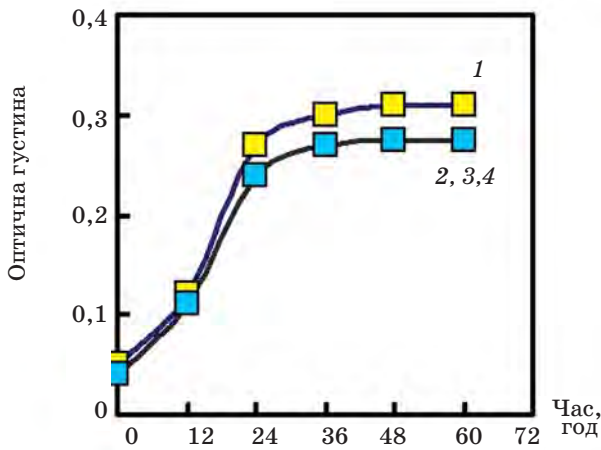


Рис. 3. Вплив екзогенного водню на накопичення біомаси на середовищі з целюлозою штамом *C. thermocellum* 5СТ.

Концентрація водню (% об.): 1 — без уведення водню; 2 — 100; 3 — 50; 4 — 30

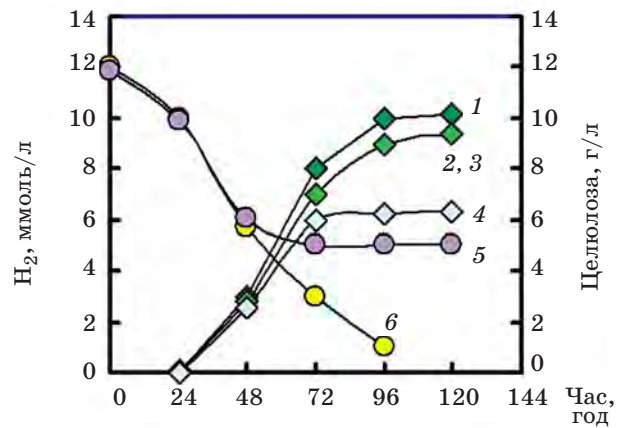


Рис. 4. Вплив екзогенного ацетату на утворення водню (1-4) та споживання целюлози (5, 6) штамом *C. thermocellum* 5СТ.

Концентрація ацетату (% об.): 1 — без ацетату; 2 — 0,1; 3 — 0,5; 4 — 50,0; споживання целюлози: 5 — введення 50,0% об. ацетату; 6 — без ацетату

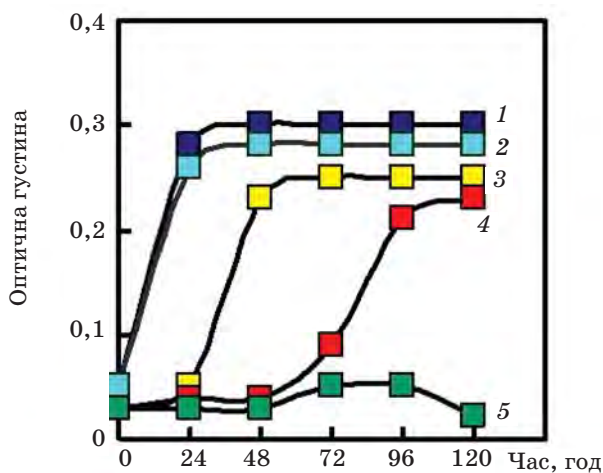


Рис. 5. Вплив екзогенного етанолу на ріст штаму *C. thermocellum* 5СТ на середовищі з целюлозою.

Концентрація етанолу (об%): 1 — без етанолу; 2 — 0,1; 3 — 0,5; 4 — 1,0-2,0; 5 — 3,0

Отримані результати підтверджують дані авторів, які показали, що поява резистентності до етанолу супроводжується значними змінами в складі мембран *C. thermocellum*; досягти істотної толерантності бактерій до етанолу неможливо через значне порушення ним структурної цілісності мембрани, що призводить до летального наслідку [17].

Отже, шляхом багаторазових пересівів селекціоновано штаму *C. thermocellum* 5СТ з високою целюлолітичною активністю. Встановлено, що целюлолітичну активність штаму 5СТ можна збільшувати під час періодичних пересівів від'ємно-доливним способом.

Клітини селекціонованого штаму *Clostridium thermocellum* 5СТ резистентні до етанолу в концентрації 2%. Збільшити утворення етанолу в 2 рази та знизити кількість ацетату в 2,5 рази в результаті трансформації субстрату можливо за рахунок підвищення концентрації введеного в середовище культурування екзогенного водню. Тобто водень може бути регулятором отримання певних метаболітів у біотехнологічних процесах.

Показано вплив дії введеного екзогенного ацетату натрію на ріст та гідроліз целюлози

штаму в концентрації 0,1–50% об. Низькі концентрації ацетату натрію (0,1–0,5% об.) не впливають на гідроліз целюлози і утворення водню штамом *C. thermocellum* 5СТ. Збільшення концентрації ацетату натрію в 10 разів спричиняє зниження гідролізу целюлози в 1,5 рази.

Селекціонований анаеробний целюлолітичний термофільний штам *C. thermocellum* 5СТ може використовуватись у біотехнологічних процесах для отримання перспективних енергоносіїв та термостабільних ензимів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Wiegel J., Tanner R., Rainey E. A. An Introduction to family Clostridiaceae. The Prokaryotes: 3rd ed. — Springer, 2006. — V. 4. — P. 654–678.
2. Бонч-Осмоловская Б. А. Изучение термофильных микроорганизмов в Институте микробиологии РАН // Микробиология. — 2004. — Т. 73, № 5. — С. 644–658.
3. Pat. US2009/058597,C12N1/20; C12P7/06; C12R1/145. Selection Of Cellulolytic Microbes With High Growth Rates / Panikov N., Sizova M., Lynd Lee R. — Filing Date: 28.09.2009; Publication Date: 01.04. 2010, WO/2010/037018.
4. Mendez B. S., Gomes R. F. Isolation of *Clostridium thermocellum* auxotrophs // Appl. Envir. Microbiol. — 1982. — V. 43. — P. 495–496.
5. Zhang Y.-H. P., Lynd L. R. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: Bioenergetics and hydrolysis product assimilation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — V. 102. — P. 7321–7325.
6. Demain A. L., Newcomb M., Wu J. H. D. Cellulase, Clostridia, and Ethanol // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2005. — V. 69. — P. 124–154.
7. Herrero A. A., Gomes R. F. Development of ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*: Effect of growth temperature // Appl. Envir. Microbiol. — 1980. — V. 40. — P. 517–577.
8. Чувильская Н. А., Атакишиева Я. Ю., Акименко В. К. Получение мутантов *Clostridium thermocellum*, резистентных к этанолу // Микробиология. — 1991. — Т. 60, № 1. — С. 107–115.
9. Карпенко В. І., Ястремська Л. С., Голодок Л. П. та ін. Взаємодія мікробних популяцій у метаногенних асоціаціях і шляхи збільшення виходу метану в метантенках // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. Біологія. Екологія. — 2006. — Т. 1, № 3/1. — С. 80–85.
10. Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2002. — V. 66. — P. 506–577.
11. Ястремская Л. С. Идентификация термофильных анаэробных микроорганизмов, изолированных из метантенка // Микробиол. журн. — 1993. — Т. 55. — Вып. 6. — С. 3–12.
12. Ястремская Л. С. Роль анаеробних мікроорганізмів у трансформації сільськогосподарської сировини в біопаливо: Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук.: 03.00.07. / Уманськ. держ. агр. ун-т. — 2008. — 20 с.
13. Чернышенко Д. В., Данько Я. Н., Таширев А. Б. и др. Культиватор для изучения ростовых процессов анаэробных микроорганизмов // Микробиол. журн. — 1990. — Т. 52. — Вып. 6. — С. 90–92.
14. Герхард Ф. Методы общей бактериологии: В 3-х т. — М.: Мир, 1984. — Т. 1–3. — 536 с.
15. Карпенко В. І., Ястремська Л. С., Голодок Л. П. та ін. Взаємодія мікробних популяцій у метаногенних асоціаціях і шляхи збільшення виходу метану в метантенках // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. Біологія. Екологія. — 2006. — Т. 1. — Вып. 14. — № 3/1. — С. 80–85.
16. Ленгелер Й., Дрекс Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х т. — М.: Мир, 2005. — Т. 1. — 656 с.
17. Williams T., Combs J., Lynn B., Strobel H. Proteomic profile changes in membranes of ethanol-tolerant *Clostridium thermocellum* // Appl. Envir. Microbiol. — 2006. — V. 74. — P. 422–432.

**СЕЛЕКЦИЯ АНАЭРОБНОГО
ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОГО
ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА
Clostridium thermocellum 5CT**

Л. С. Ястремская
О. А. Васильченко

Национальный авиационный университет,
Институт экологической безопасности, Киев

E-mail: lorarem@gmail.com

Проведена селекция анаэробного термофильного целлюлолитического штамма *Clostridium thermocellum* 5CT многократным пересеванием и действием возрастающих концентраций экзогенных химических соединений. Рост культуры оценивали по образованию биомассы, накоплению конечных продуктов метаболизма и интенсивности гидролиза целлюлозы. Полученная культура *Clostridium thermocellum* 5CT резистентна к этанолу в концентрации 2%. Показано, что введение водорода в среду культивирования до концентрации 100% об. не ингибирует рост культуры, приводит к увеличению образования этанола в 2 раза и снижению образования ацетата в 2,5 раза. Введение ацетата натрия в малых концентрациях также не угнетает рост культуры, в то время как 50,0% об. в среде существенно ингибирует его; гидролиз целлюлозы в этом случае снижается в 1,5 раза.

Селекционированный анаэробный целлюлолитический термофильный штамм *C. thermocellum* 5CT может использоваться в биотехнологических процессах для получения перспективных энергоносителей и термостабильных энзимов.

Ключевые слова: анаэробные термофильные целлюлолитические бактерии, *Clostridium thermocellum*, брожение целлюлозы.

**SELECTION OF ANAEROBIC
CELLULOLYTIC THERMOPHILIC
STRAIN *Clostridium thermocellum* 5CT**

L. S. Yastremskaya
O. A. Vasylychenko

National Aviation University, Institute
for Environmental Security, Kyiv

E-mail: lorarem@gmail.com

Selection of anaerobic thermophilic cellulolytic strain of *Clostridium thermocellum* 5ST was performed under multiple re-inoculations and effect of increasing concentrations of the exogenous compounds. Culture growth was evaluated by biomass formation, final metabolite products accumulation, and intensity of cellulose hydrolysis. Obtained *Clostridium thermocellum* 5CT culture was resistant to ethanol at concentration 2%. It is shown that hydrogen adding to culture medium up to 100% vol. doesn't inhibit growth of the culture, results in increasing of ethanol formation in two times, and decreases acetate formation in 2.5 times. Sodium acetate adding in low concentrations doesn't inhibit growth of the culture, whereas 50.0% vol. in the media inhibits essentially growth of the culture; cellulose hydrolysis in this case decreases in 1.5 times.

Selected anaerobic cellulolytic thermophilic strain *C. thermocellum* 5CT can be used in biotechnological processes for perspective energy carriers and thermostable enzymes obtaining.

Key words: anaerobic cellulolytic thermophilic bacteria, *Clostridium thermocellum*, cellulose fermentation.