ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის
ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

თამარ ბურდული

საქართველოს სხვადასხვა ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილობა და მათ მიერ ამილაზებისა და ცელულაზების სინთეზის უნარის გამოვლენა

03.00.23 _ბიოტექნოლოგია

**ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიტატის სამეცნიერო
ხარისხის მოსაპოვებლად წარდგენილი დისერტაციის**

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი

2006

სამუშაო შესრულებულია ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: **გიორგი კვესიტაძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი

ლალი ქუთათელაძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი

ოფიციალური ოპონენტები: **ინგა გიორგაძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
03.00.07

ნინო ომიაიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
03.00.23

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის ,,____" _____ _____ სთ-ზე
ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის სადისერტაციო საბჭოს B03.04 №1 სხდომაზე

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის ბიბლიოთეკაში

მისამართი: 0159, თბილისი, დ. აღმაშენებლის ხეივანი მე-10 კმ.

ავტორეფერატი დაიგზავნა 2006 წლის ,,_____" _____

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი,
ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიტატი /ნ. შენგელია/

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

საქართველოს სხვადასხვა ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილობა და მათ მიერ ამილაზებისა და ცელულაზების სინთეზის უნარის გამოვლენა

<u>**პრობლემის აქტუალობა**</u>

უკანასკნელი 30 წლის მანძილზე ბიოტექნოლოგიის ერთ-ერთ ყველაზე სწრაფად და ინტენსიურად მზარდ მიმართულებას წარმოადგენს მიკრობიოლოგიური სინთეზი. სადღეისოდ მიკრობიოლოგიური სინთეზი აქტიურ კონკურენციას უწევს ქიმიურ სინთეზს ისეთ დარგში, როგორიცაა დაბალმოლეკულური ნაერთების მიღება სამრეწველო მასშტაბით. რაც შეეხება მაღალმოლეკულურ ნაერთებს, კერძოდ ცილებსა და ფერმენტებს, აქ მიკრობიოლოგიურ სინთეზს ანალოგი არ გააჩნია.

გასათვალისწინებელია ის გარემოება, რომ ფერმენტების წარმომქმნელ მიკროორგანიზმთა დიდი უმრავლესობა _ რომელ ტაქსონომიურ ჯგუფსაც არ უნდა ეკუთვნოდნენ _ არიან მეზოფილები ანუ ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმები. იქიდან გამომდინარე, რომ მრეწველობის მთელ რიგ დარგებში, ათეულობით წლების მანძილზე, გამოიყენება მეზოფილური მიკროორგანიზმების მიერ

წარმოქმნილი ფერმენტები, სავარაუდოა რომ, ამ ტიპის მიკროორგანიზმებმა პრაქტიკულად ამოწურეს თავისი შესაძლებლობა.

მიკრობიოლოგიურ გარდაქმნებზე ან მიკროორგანიზმებიდან გამოყოფილი ფერმენტების მოქმედებაზე აგებული ხარისხობრივად ახალი ტექნოლოგიების შექმნისათვის აუცილებელი ხდება განსაკუთრებულ პირობებში (მაღალი ტემპერატურა, მჟავე და ტუტე გარემო, მარილების მაღალი კონცენტრაცია) მზარდი მიკროორგანიზმების სელექცია და ამ კრიტიკული პირობების მიმართ სტაბილური ფერმენტების გამოყენება. მიცელიალური სოკოები, როგორც ეუკარიოტული ორგანიზმები, პროკარიოტებთან შედარებით, ხასიათდებიან გენეტიკური ინფორმაციის უფრო ფართო სპექტრით და ორგანული ნაერთების მრავალფეროვანი კონვერსიის უნარით.

დსთ_ს ქვეყნებში _ რუსეთი (მოსკოვი, სანკტ-პეტერბურგი), უკრაინა (კიევი), უზბეკეთი (ტაშკენტი) _ არსებული მიცელიალური სოკოების (მიკროსკოპული, ბაზიდიალური) კოლექციები ძირითადად შეიცავენ მეზოფილურ მიცელიალურ სოკოებს, რომლებიც გამოყოფილია ჩვეულებრივი ეკოლოგიური ნიშებიდან.

ექსტრემოფილური მიცელიალური სოკოების სელექციის თვალსაზრისით ძალიან დიდ ინტერესს იწვევს კავკასიის რეგიონი, რომელიც 17-ზე მეტი ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონისაგან შედგება და მრავალ ექსტრემალურ გარემოს მოიცავს. ამასთან, უნდა აღინიშნოს, რომ კავკასიის რეგიონში გავრცელებული მიკოფლორა პრაქტიკულად შესწავლილი არ არის.

ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიცელიალური სოკოების კოლექციის შექმნას, რომელშიც წარმოდგენილი იქნება კავკასიისათვის დამახასიათებელი მიცელიალური სოკოები, თეორიულის გარდა, სამრეწველო თვალსაზრისითაც დიდი მნიშვნელობა აქვს, რადგან იქმნება იმის შესაძლებლობა, რომ ცალკეული მეტაბოლიტების მწარმოებელი აქტიური შტამების სელექცია ჩატარდეს.

<u>კვლევის მიზანი და ამოცანები:</u>

კვლევის მიზანს წარმოადგენს კავკასიის სხვადასხვა ექსტრემალური ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კოლექციის შექმნა. ამ მიზნით დასახული იქნა შემდეგი ამოცანები:

_ საქართველოს სხვადასხვა ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების ახალი კულტურების გამოყოფა,

_ გამოყოფილ კულტურებს შორის კარბოჰიდრაზების (α- და გლუკო ამილაზების, ცელულაზას) პროდუცენტების გამოვლენა,

_ მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა,

_ კარბოჰიდრაზების აქტიური პროდუცენტებისათვის ლაბორატორიულ პირობებში კულტივირების პირობების შერჩევა,

_ შერჩეული აქტიური პროდუცენტების ფიტო- და ზოოპათოგენური თვისებების შესწავლა,

_ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების ფერმენტული პრეპარატების მიღება.

<u>ნაშრომის მეცნიერული სიახლე:</u>

კავკასიის რეგიონის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოებით შექმნილია კოლექცია, რომელიც მოიცავს 351 კულტურას.

გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს შორის, ეკოლოგიური ნიშების მიხედვით, დადგენილია დომინანტი გვარები. შექმნილი საერთო კოლექციიდან გამოყოფილია ექსტრემოფილური სოკოების კოლექცია (234 კულტურა). მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს შორის სკრინინგის შედეგად გამოვლენილია α-ამილაზაას 37 პროდუცენტი, გლუკოამილაზას _ 51 და ცელულაზას _ 55 პროდუცენტი. მათ შორის გამოვლენილია ექსტრემოფილური კულტურები. შერჩეულია, აღნიშნული ფერმენტების, აქტიური პროდუცენტები. დადგენილია, ფერმენტების აქტიური პროდუცენტი შტამების, კულტივირების ოპტიმალური პირობები და გამოვლენილია სტაბილური ფერმენტები.

<u>ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა:</u>

ფერმენტებზე დაფუძნებული ბიოტექნოლოგიები შეიძლება განვიხილოთ, როგორც საიმედო, მცირენარჩენიანი, ჯანსაღი და ეკოლოგიურად შედარებით დაბალი რისკის მქონე ტექნოლოგიები. ამდენად ძალიან აქტუალურია განსხვავებულ ანუ ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების სელექცია და მათგან მიღებული ფერმენტების რეზისტენტობის შეფასება სხვადასხვა კრიტიკული პირობების მიმართ.

ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების კოლექციის შექმნით, შესაძლებელია კულტურებს შორის საძიებელი ფერმენტების (α-ამილაზა, გლუკოამილაზა, ცელულაზა) ახალი და აქტიური პროდუცენტების შერჩევა, კულტივირების პირობებისა და საკვები არეების ოპტიმიზაციის გზით მაღალაქტიური შტამების სელექცია, მათგან გამოყოფილი სტაბილური ფერმენტების სხვადასხვა სისუფთავის პრეპარატების მიღება, და ამ სტაბილური ფერმენტების სოფლის მეურნეობაში, მრეწველობაში და მედიცინაში გამოყენება.

უახლოეს მომავალში სტაბილურ ფერმენტებზე დაფუძნებული ტექნოლოგიების საშუალებით შესაძლებელი გახდება ისეთი პრობლემების გადაწყვეტა, როგორიცაა ეკოლოგიურად სუფთა პროდუქტების წარმოება, ენერგიის დამზოგველი ტექნოლოგიების განვითარება, ბიო-საწვავის წარმოება, გარემოს დაცვაში მიკრობული რემედიაციის უფრო ინტენსიურად ჩართვა, ახალი მრავალმიზნობრივი მცირენარჩენიანი ტექნოლოგიების შექმნა და სხვა.

<u>ნაშრიმის აპრობაცია.</u> დისერტაცია აპრობირებულია საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის ბიოტექნოლოგიისა და მცენარეული სუბსტრატების ბიოკონვერსიის ლაბორატორიების გაერთიანებულ სხდომაზე.

<u>პუბლიკაციები.</u> დისერტაციის მასალების მიხედვით გამოქვეყნებული 6 სამეცნიერო შრომა.

<u>ნაშრომის მოცულობა და სტრუქტურა.</u> სადისერტაციო ნაშრომი შეიცავს შესავალს, ლიტერატურულ მიმოხილვას, ექსპერიმენტულ ნაწილს, დაკვნებს და ციტირებული ლიტერატურის სიას. გვერდს, ილუსტრირებულია ცხრილით, ნახაზით, ფოტოსურათით.

<u>ექსპერიმენტული ნაწილი</u>

კვლევის მასალები და მეთოდები:

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან _ კერძოდ: ალპური ზონა - რაჭის რეგიონი (ნეშომპალა-კარბონატული ნიადაგები), სუბალპური ზონა - ყაზბეგის რაიონი (მთა-მდელოთა ნიადაგები), ტენიანი სუბტროპიკული კლიმატური ზონა - ფოთის რაიონი (დაბლობის ჭაობიანი და ეწერი ნიადაგები), სტეპების ზონა - სიღნაღის რაიონი (შავმიწა და წაბლა ნიადაგები), ნახევრადუდაბნოს ზონა - მარნეულის რაიონი (წაბლა, დამლაშებული ბიცობიანი ნიადაგები), მშრალი სუბტროპიკული კლიმატური ზონა - თელავის რაიონი (ყავისფერი, შავმიწა და ალვიური ნიადაგები), კონტინენტური კლიმატური ზონა - ბორჯომის რაიონი (ტყის ყომრალი და გაეწერებული ნიადაგები, ვულკანური ქანები) _ გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები.

მიკროორგანიზმების გამოყოფა სხვადასხვა ნიადაგებიდან: მიკროსკოპული სოკოების კულტურების გამოსაყოფად თავდაპირველად აღნიშნული ზონებიდან აღებულია 10-10 გასაშუალებული ნიმუში (Fomin, 2001).

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 (Звягинцев и др. 1980.). დამუშავებული ნიადაგის ნიმუშების ჩათესვას ვახორციელებდით ვაკსმანის ნიადაგების განზავების მეთოდით (Waksman, 1916.). ვიღებდით შემდეგ განზავებებს - 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000; ნიადაგის პირდაპირი ჩათესვის მეთოდით (Warcup, 1950.). 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, ჰემიცელულოზა, სახამებელი).

2. საკვები არეები, რომლებიც შეიცავენ სპეციფიურ ქიმიურ ნაერთებს (ზრდის ინჰიბიტორებს) და არატოქსიკურ ნივთიერებებს, რომლებიც მეტაბოლიზმში მონაწილეობას არ იღებენ, მაგრამ ცვლიან არის პირობებს (მჟავიანობას, ტუტიანობას). ზემოთ აღნიშნული პრინციპების შესაბამისად შერჩეულ იქნა 5 საკვები არე.

საკვები არეები:

1. უნივერსალური არე - შემადგენლობა 1ლ-ზე: 0,5ლ ლუდის ბადაგი 7^0B, 0,5ლ ონკანის წყალი, 20,0გ აგარ-აგარი. (pH-5,5-6,0)
2. ჩაპეკის შემჟავებული არე (ბაქტერიების დასათრგუნავად) – შემადგენლობა %: გლუკოზა-2,0, $NaNO_3$-0,91, KH_2PO_4-0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4 \cdot H_2O$-0,002, 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, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4 \cdot H_2O$-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, $MgSO_4.7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4.H_2O$-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, $MgSO_4.7H_2O$-0,03, NaCl-0,01, $FeCl_2$ -0,001, $NaNO_3$- 0,25, აგარ-აგარი-2,0 (pH-5,5-6,0).

სტერილიზაციის რეჟიმი 0,5 ატმ, 30წთ. კულტივირებას ვაწარმოებდით 28^0-30^0C-ზე 10 დღის განმავლობაში.

ნიადაგებიდან მიკოფლორის პირველადი გამოყოფის შემდეგ, პირველადი ჩანათესებიდან, გამოვყავით სუფთა კულტურები, რომელთა იდენტიფიცირებისათვის გამოვიყენეთ საკვლევები, (Пидопличко, Милько, 1971.); (Билай, Коваль, 1988.); (Литвинов, 1967.); (Malloch, et al. 1981.).

გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კოლონიების წარმომქმნელ ერთეულს (კწე) ვსაზღვრავდით 1გრ. მშრალ ნიადაგზე გადაანგარიშებით, ფორმულა A=abv/g (Дудка и др 1982).

გამოყოფილი კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის (ტემპერატურა და pH) დადგენის მიზნით მიკრომიცეტებს ვზრდიდით 5 - 55^0 C-მდე, 5^0C-ის და pH-2,0 დან pH-10,0 მდე 0,5 ინტერვალით, საწყის საკვებ არეში. ტემპერატურისა და pH-ის ოპტიმუმად მიღებული იყო სოკოების კულტურების მაქსიმალური ნაზრდი, რომელიც ისაზღვრებოდა კოლონიის დიამეტრის ზრდით 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%).

კარბოჰიდრაზების სკრინინგს ვაწარმოებდით სიღრმული კულტივირებით. ჩასათესი მასალა წარმოადგენდა 10 დღიანი კულტურის კონიდიების სუსპენზიას. მიკროსკოპული სოკოების ცალკეული შტამების სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა 750 მლ-იან ერლენმეიერის კონუსურ კოლბებში, თერმოსტატირებულ სანჯღრეველაზე (180-200ბრ/წთ), 30^0 C-ზე, 72 საათის განმავლობაში.

ამილაზების პროდუცენტების გამოსავლენად სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა თხევად არეში, რომლის შემადგენლობაა%: სახამებელი-6,0, $NaN0_3$-0,91, KH_2PO_4-0,1, $MgSO_4.7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4.H_2O$ -0,0002, ალაოს ღივები-3,0. pH 5,0-5.5

ცელულაზას პროდუცენტების გამოსავლენად სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა თხევად არეში, რომლის შემადგენლობაა%: მიკროკრისტალური ცელულოზა-0,1, $NaN0_3$-0,3, KH_2PO_4-0,2, $MgSO_4.7H_2O$-0,05, სიმინდის ექსტრაქტი-1,5.
pH 5,0-5.5. საერთო ცელულაზურ აქტივობას ვსაზღვრავდით ცნობილი მეთოდით (Ghose, 1987.), რომელიც დაფუძნებულია ცელულაზის უნარზე, მოახდინოს უხსნადი სუბსტრატების (კერძოდ, ფილტრის ქაღალდის) ჰიდროლიზი ხსნად მონოსაქარიდებამდე და ოლიგო-საქარიდებამდე. აღმდგენელ შაქრებს ვსაზღვრავდით სომოჯი-ნელსონის მეთოდით (Nelson, 1944; Somogyi, 1952.). გლუკოამილაზურ აქტივობას ვაფასებდით დალგვისტის მეთოდით (Dahlguist, 1961.). ფერმენტის აქტივობაზე ვმსჯელობდით დროის ერთეულში წარმოქმნილი გლუკოზის რაოდენობის მიხედვით. α-ამილაზის აქტივობას ვსაზღვრავდით, ფერმენტული რეაქციის შედეგად მიღებული იოდ-სახამებლის ფერადი რეაქციის ინტენსივობით (Рухлядева, Горячева 1960.)

ფიტოპათოგენურობის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით ბერესტეცკის მეთოდს (Берестецкий, 1963.): ხორბლის მარცვლებს ვასველებდით სოკოს კულტურის კულტურალური ხსნარით. პათოლოგიურად ითვლებოდა ის კულტურები, რომლებიც იწვევდნენ მარცვლების ზრდის შეფერხებას 30%-ით ან მეტით. მიცელიალური სოკოების კულტურების ზოოპათოგენურობის განსაზღვრას ვახდენდით კურდღლის ვენაში სოკოს

სუსპენზიის შეყვანით (Ohga, et al 1966). ცხოველის რეაქციას ვსწავლობდით კლინიკური დაკვირვებებით, პათანატომიური განაკვეთებისას, ორგანოების მიკროსკოპული და მიკოლოგიური შესწავლის გზით.

ფერმენტული პრეპარატების მისაღებად კულტურალური სითხის ფილტრატს ვაციებდით 4^0C-მდე და ვუმატებდით ცივ ეთილის სპირტს (ცელულაზასთვის 4 მოცულობას, α-ამილაზასთვის – 3-ს, გლუკოამილაზასთვის - 3,5-ს). ნარევს ვტოვებდით 15-20 წთ-ის განმავლობაში, წარმოქმნილ ნალექს ვაშრობდით ცენტრიფუგირებით (6000 ბრ/წთ 10 წთ-ის განმავლობაში) და შემდეგ ვაშრობდით ლიოფილურად.

ფერმენტების მოქმედების pH ოპტიმუმების დასადგენად საინკუბაციო არის pH-ს ვცვლიდით pH-2,0-დან – pH-10 მდე, 0,5 ის ინტერვალით. აქტივობები ისაზღვრებოდა სტანდარტული მეთოდით და გამოისახებოდა პროცენტებში.

ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმების დასადგენად ფერმენტულ აქტივობას ვზომავდით 20^0-დან - 80^0C-მდე 5^0C ტემპერატურის ინტერვალში. ამილაზებისა და ცელულაზების მოქმედების ოპტიმუმების დადგენისას ფერმენტული პრეპარატები იხსნებოდა 0,05 M აცეტატურ ბუფერში, pH=4,7. ამილაზების შემთხვევაში სუბსტრატად ვიყენებდით 1%-იან სახამებლის ხსნარს.

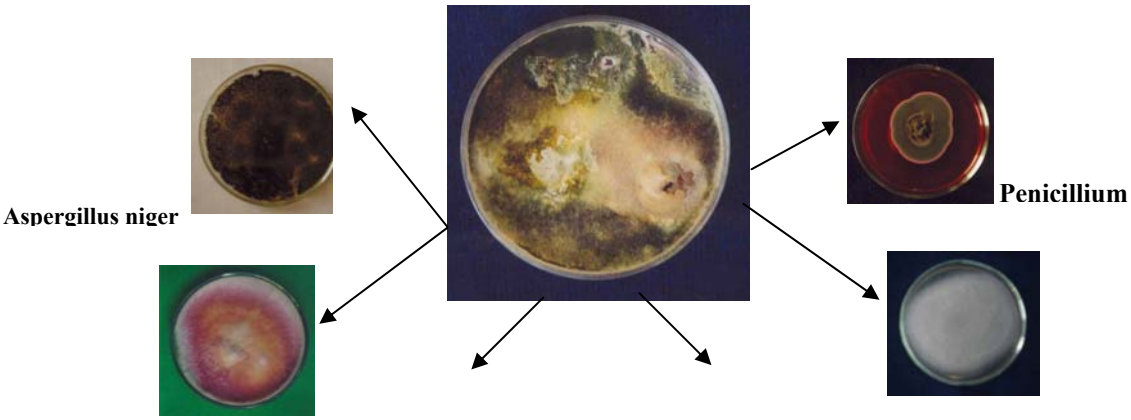
<u>მიღებული შედეგები და მათი განხილვა</u>

მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია:

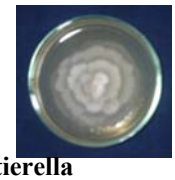
საქართველოში არსებული 17-ზე მეტი ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონებიდან შერჩეულ იქნა – რაჭის, ყაზბეგის, ფოთის სიღნაღის, თელავის, მარნეულის, ბორჯომის რეგიონები, მათი ექსტრემალური პირობების გამო. სავარაუდოდ ამ ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკრომიცეტების დიდი რაოდენობა უნდა ყოფილიყო ექსტრემოფილი.

ნიადაგიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები იზრდებოდა თერმოსტატში 30^0 C-ზე. პეტრის თასებზე ჩათესილი ნიადაგის ნიმუშების დათვალიერება და აღწერა ხდებოდა კულტივირების მე-3, მე-5, მე-7, მე-10 დღეებში. ოპტიმალური აღმოჩნდა განზავებები $1/10^2$ და $1/10^3$. გამოყოფილი Aკოლონიების წარმომქმნელი ერთეული (კწე) განისაზღვრა 1 გრამში, ფორმულა A=abv/g. გამოყოფილი სუფთა კულტურები გადაგვქონდა მყარ აგარიზირებულ საკვებ არიან სინჯარებში. კულტივირების ტემპერატურა იყო იგივე, რაც გამოყოფის პროცესში (28^0C). კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების ზოგიერთი სუფთა კულტურა წარმოდგენილია 1-ელ სურათზე:

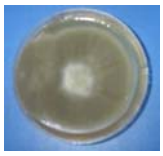
<u>სურათი 1.</u>



Fusarium



Mortierella



Rizopus

Mucor

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა კვლევებმა გვიჩვენა: მშრალი სუბტროპიკული კლიმატური და სტეპების ზონის მიკოფლორა გაცილებით მრავალრიცხოვანია, ამასთანავე მრავალფეროვანი. ასევეა კონტინენტალური კლიმატური ზონა. ალპური და სუბალპური ზონების მოკოფლორა მრავალფეროვანია, მაგრამ მცირერიცხოვანი. ტენიანი სუბტროპიკული კლიმატური ზონის მიკოფლორა ერთფეროვანი და მცირერიცხოვანია. ნახევრად უდაბნოს ზონის მიკოფლორაც მწირია.

კულტურალურ-მორფოლოგიურ თვისებებს ვახასიათებდით პეტრის თასზე გაზრდილი კულტურების კოლონიების, მიკროსკოპის მცირე გადიდებით დათვალიერებისას, შემდეგ კი მზადდებოდა პრეპარატები საანალიზოდ.

პირველ შემთხვევაში ვადგენდით შერწყმული სპორების (სპორა-შერწყმულობა) მიერთების ხასიათს (ტიპი), საჰაერო ან სუბსტრატულ მიცელიუმთან, სპორანგიამატარებლობისა და კონიდიამატარებლობის დატოტვას, სპორებისა და კონიდიების (ერთეული, ჯგუფური) მიერთების უნარს და ა.შ. მოკლედ ყველა იმ თვისებას, რომელთა დადგენა არ ხერხდება პრეპარატის საშუალებით.

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

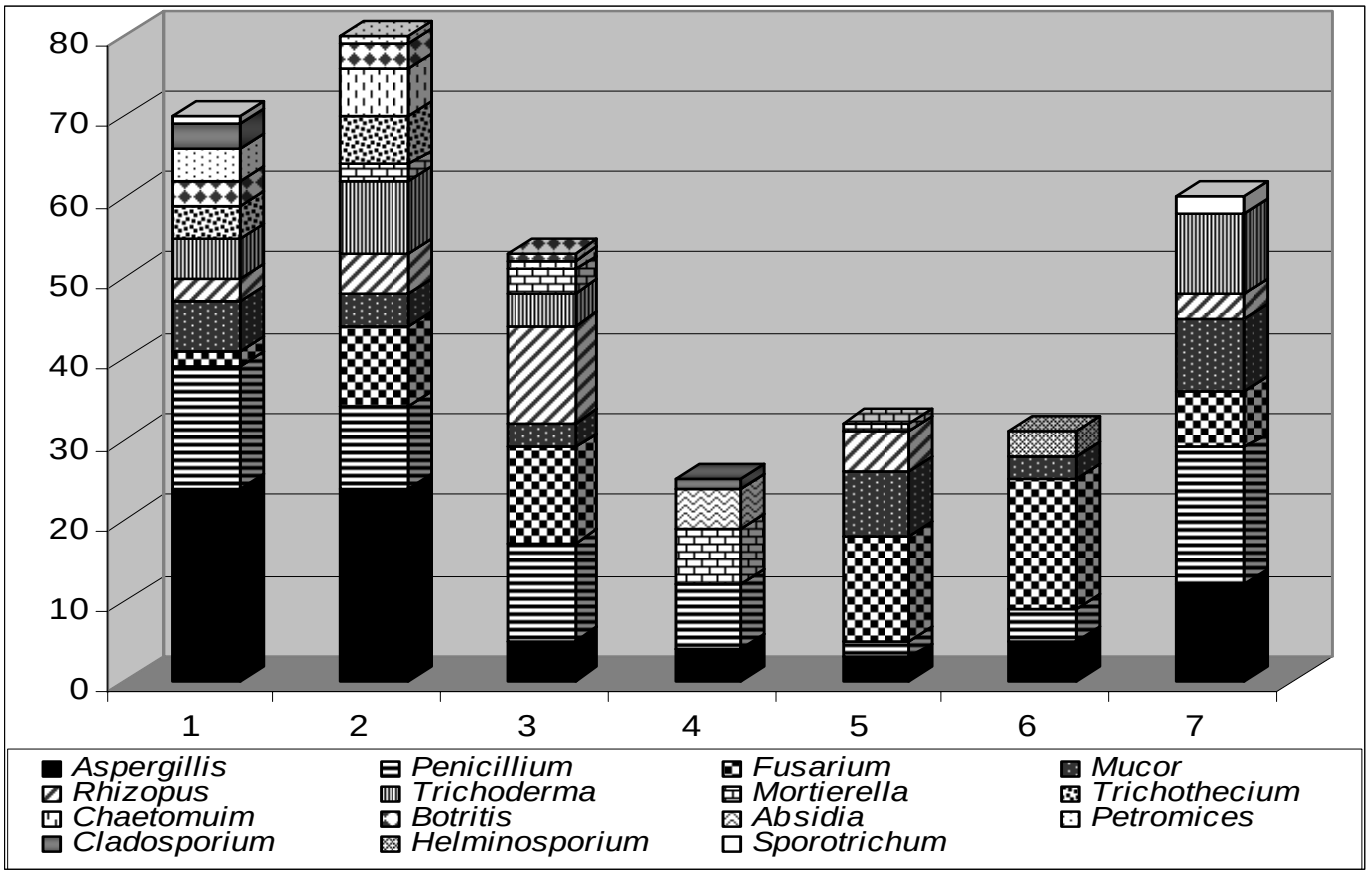
გარდა ამისა, მზადდებოდა პრეპარატი – ანაბეჭდი: აგარიზებული საკვები არიდან ვჭრიდით დაახლოებით 10 მმ დიამეტრის კოლონიას, ვათავსებდით სასაგნე მინაზე კოლონიით ზევით. ზემოდან, ფრთხილად და მჭიდროდ, ვაფარებდით სტერილურ საფარ მინას. შემდეგ საფარ მინას ვათავსებდით სასაგნე მინაზე, რომელზეც წინასწარ დაწვეთებული იყო წყალი ან მეთილენის ლურჯი. მზა პრეპარატის კვლევას ვახდენდით მშრალი ოპტიკური სისტემით.

გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებში დავადგინეთ დომინანტი გვარები. აღსანიშნავია, რომ ყველა ნიადაგობრივ კლიმატურ ზონაში დომინირებს ***Aspergillus***-ის და ***Penicillium***-ის გვარი, ***Fusarium***-ის გვარი არ გვხვდება მხოლოდ სუბალპურ ზონაში, მაშინ, როცა ***Absidia***-ს გვარის მიკრომიცეტები მხოლოდ ამ ზონაშია გავრცელებული. ***Aspergillus***-ის გვარი ფართოდაა წარმოდგენილი წაბლა და შავმიწა ნიადაგებში, ხოლო ტყის ყომრალ ნიადაგებში სჭარბობს ***Penicillium***-ის გვარი (ცხ. 1, ნახ. 1.).

ცხრილი 1.

კავკასიის სხვადასხვა ნიადაგებში გაოვლენილი მიკროსკოპული სოკოების შეხვედრის სიხშირე გვარების მიხედვით

№	კლიმატური ზონები	*Aspergillis*	*Penicillium*	*Fusarium*	*Mucor*	*Rhizopus*	*Trichoderma*	*Mortierella*	*Trichothecium*	*Chaetomuim*	*Botritis*	*Absidia*	*Petromices*	*Cladosporium*	*Helminosporium*	*Sporotrichum*	
1	მშრალი სუბტროპიკული ზონა	24	15	2	6	3	5		4		3		4	3		1	70
2	სტეპის ზონა	24	10	10	4	5	9	2	6	6	3		1				80
3	ტენიანი სუბტროპიკული ზონა	5	12	12	3	12	4	3		1	1						53
4	სუბალპური ზონა	4	8					7				5		1			25
5	ალპური ზონა	3	2	13	8	5		1									32
6	ნახევრად უდაბნოს ზონა	5	4	16	3										3		31
7	კონტინენტური ზონა	12	17	7	9	3	10									2	60
	მიკროსკოპული სოკოების რაოდენობა გვარის მიხედვით	77	68	60	33	28	28	13	10	7	7	5	5	4	3	3	351



ნახაზი 1.

ამრიგად, ჩატარებული სამუშაოს შედეგად შეიქმნა მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია, რომელიც მოიცავს 351 კულტურას.

შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ შექმნილი კოლექცია, კარბოჰიდრაზების პროდუცენტი მიკრომიცეტების, ექსტრემოფილური კულტურების გამოსავლენად.

<u>კარბოჰიდროლაზების (ამილაზების, ცელულაზის) პროდუცენტი – მიკროსკოპული სოკოების სკრინინგი.</u>

კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს შორის ვაწარმოეთ ფერმენტების (ამილაზების, ცელულაზას) პროდუცენტების სკრინინგი სიღრმული კულტივირების პირობებში.

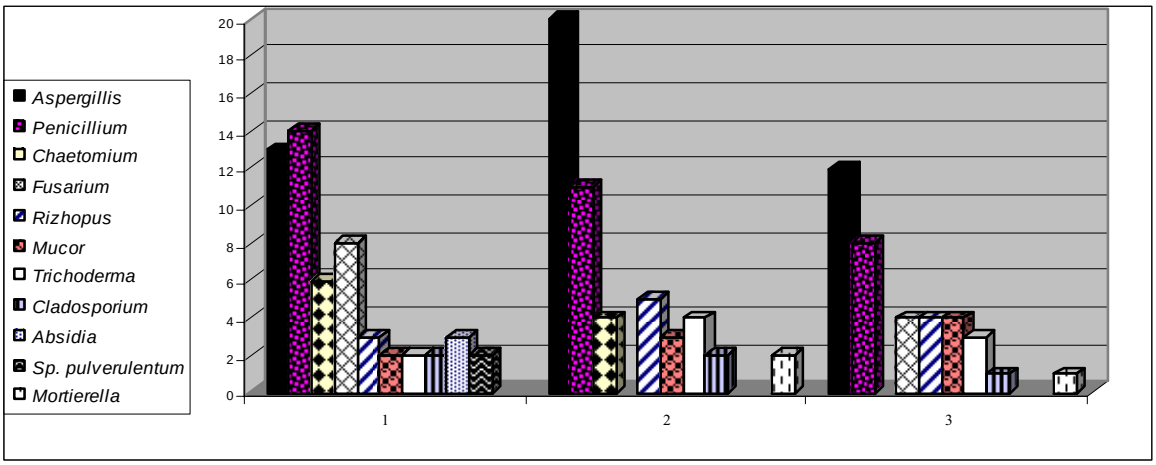
აღსანიშნავია, რომ, კულტურების გამოყოფის დროს, შერჩეული საკვები არეები, განსხვავებული ნახშირბადის წყაროებით, საშუალებას გვაძლევდა გვემსჯელა რომელი ფერმენტის უპირატესი სინთეზით უნდა ხასიათდებოდეს ამა თუ იმ არეზე გამოყოფილი კულტურა. მართალია კარბოჰიდრაზების პროდუცენტები შერჩეული იქნა ყველა საკვები არიდან გამოყოფილ კულტურას შორის, მაგრამ აღმოჩნდა, რომ ამილაზებისა და ცელულაზას პროდუცენტების დაახლოებით 90% გამოიყო ამ ფერმენტების პროდუცენტებისათვის სპეციფიკური საკვები არეებიდან.

ნახშირბადის წყაროდ აღებული იყო ისეთი სუბსტრატები, რომლებიც საძიებელი ფერმენტების ინდუცირებადი უნარით ხასიათდება. მაგალითად, ამილაზების პროდუცენტების შესარჩევად, ნახშირბადის წყაროდ, ვიყენებდით სახამებელს, ცელულაზების _ მიკროკრისტალურ ცელულოზას. საბოლოოდ გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა გვარებიდან შერჩეულ იქნა α-ამილაზას 37, გლუკოამილაზას 51, ცელულაზას 55 პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკო. (ცხ. 2 და ნახ. 2)

ცხრილი. 2
ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოები

№	ცელულაზას პროდუცენტები	გლუკო ამილაზას პროდუცენტები	α-ამილაზას პროდუცენტები
1	*Aspergillis* sp. S51	*Aspergillis* sp. S51	*Aspergillis* sp. S53
2	*Aspergillus* sp. S 60	*Aspergillis* sp. S52	*Aspergillis niger* S54
3	*Aspergillus* sp. S71	*Aspergillis* sp. S53	*A. versicolor* S83
4	*Aspergillus* sp. T2	*Aspergillis* sp. S58	*Aspergillis* sp. S63
5	*Aspergillus* sp. T5	*Aspergillus* sp. S 60	*Aspergillis* sp. S71
6	*Aspergillus* sp. T6	*A. niger* S64	*Aspergillis* sp. T10
7	*Aspergillus* sp. T9	*A. niger* S65	*Aspergillis* sp. R5
8	*Aspergillus* sp. T10	*Aspergillis* sp. S71	*Aspergillis* sp. S54’
9	*Aspergillus* sp. T20	*Aspergillis* sp. S73	*Aspergillus* sp. S 16
10	*Aspergillus* sp. T55	*Aspergillis* sp. T2	*A. niger* B47
11	*A. versicolor* S83	*Aspergillis* sp. T10	*A. niger* B80
12	*A. terreus* T39	*Aspergillis* sp. T31	*A. oryzae* S27
13	*A. batatae* B50	*Aspergillis* sp. S2	*Fusarium* sp. S56
14	*Chaetomium* sp. S67	*Aspergillis* sp. K2	*Fusarium* sp. R16
15	*Chaetomium* sp. S77	*A .niger* M 8	*Fusarium* sp. R20
16	*Chaetomium* sp. S5	*A. awamori* S11	*Fusarium* sp. S27
17	*Chaetomium* sp. S26	*A. awamori* T23	*Fusarium* sp. R29
18	*Chaetomium* sp. P36	*A .niger* 68B	*Rhizopus* sp. S75
19	*Chaetomium* sp. T35	*A niger* 75B	*Rhizopus* sp. S76
20	*Trichoderma* sp. S78	*Aspergillis* sp. S51’	*Rhizopus* sp. T33
21	*Trichoderma* sp. P10	*Penicillium* sp. P5	*Trichoderma* sp. S79
22	*Penicillium* sp. P11	*Penicillium* sp. S48	*Trichoderma* sp. P10
23	*Penicillium* sp. S80	*Penicillium* sp. S80	*Trichoderma* sp. P11

24	*Penicillium* sp. S84	*Penicillium* sp. T21	*Penicillium* sp. S80
25	*Penicillium* sp. T21	*Penicillium* sp. T25	*Penicillium* sp. T21
26	*Penicillium* sp. T25	*Penicillium* sp. S32	*Penicillium* sp. T25
27	*Penicillium* sp. S4	*Penicillium* sp. S35	*Penicillium* sp. T26
28	*Penicillium* sp. S10	*Penicillium* sp. S46	*Penicillium* sp. R15
29	*Penicillium* sp. S29	*Penicillium* sp. T57	*Penicillium* sp. S46
30	*Penicillium* sp. S35	*Penicillium* sp. K17	*Penicillium* sp. T52
31	*Penicillium* sp. S60’	*Penicillium* sp. K28	*Penicillium* sp. T57
32	*Penicillium* sp. T53	*Mucor* sp. S57	*Mucor* sp. T37
33	*Penicillium* sp. K17	*Mucor* sp. K32	*Mucor* sp. R33
34	*Penicillium* sp. K19’	*Mucor* sp. K55	*Mucor* sp. K22
35	*Penicillium* sp. K36	*Chaetomium* sp. S67	*Mucor* sp. T18
36	*Cladosporium* sp. T27	*Chaetomium* sp. S77	*Cladosporium* sp. T48
37	*Cladosporium* sp. T48	*Chaetomium* sp. P36	*Mortierella* sp. S34
38	*Fusarium* sp. T30	*Chaetomium* sp. S’48	
39	*Fusarium* sp. R8	*Cladosporium* sp. T38	
40	*Fusarium* sp. R20	*Cladosporium* sp. T48	
41	*Fusarium* sp. R27	*Rhizopus* sp. R1	
42	*Fusarium* sp. R28	*Rhizopus* sp. R22	
43	*Fusarium* sp. S10	*Rhizopus* sp. S33	
44	*Fusarium* sp. S61’	*Rhizopus* sp. S13	
45	*Fusarium* sp. P4	*Rhizopus* sp. P39	
46	*Rizhopus* sp. R22	*Trichoderma* sp. S57’	
47	*Rizhopus* sp. R26	*Trichoderma* sp. P7	
48	*Rizhopus* sp. P39	*Trichoderma* sp. P10	
49	*Absidia* sp. K61	*Trichoderma* sp. P11	
50	*Absidia* sp. K69	*Mortierella* sp. K64	
51	*Absidia* sp. K68	*Mortierella* sp. K33	
52	*Mucor* sp. K70		
53	*Mucor* sp.T54		
54	*Sp. pulverulentum* S7		
55	*Sp. pulverulentum* S43		



ნახაზი 2.

1. ცელულაზას პროდუცენტები;
2. გლუკოამილაზას პროდუცენტები;
3. α-მილაზას პროდუცენტები;

α-ამილაზას ყველაზე აქტიური პროდუცენტებია შავი და მომწვანო-მოყვითალო ასპერგილები. ინტერესს იწვევს ***Mortierela***-ს გვარის ორი კულტურა, რომლებიც ლიტერატურული მონაცემებით ამილაზას პროდუცენტებად არ არიან ცნობილი; ცელულაზას პროდუცენტებს შორის სჭარბობს ***Aspergillus*** და ***Penicillium***-ის გვარები.

ამრიგად, ჩვენს მიერ გამოყოფილ მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს შორის 24% (87 შტამი) საკვლევი ფერმენტის პროდუცენტია. ეს კი მიუთითებს, რომ ასეთი კოლექცია ძვირფასი "საბადოა". ფერმენტების მწარმოებელი ორგანიზმებისა, რომელთაც მომავალში პრაქტიკული გამოყენების ფართო პერსპექტივა ექნებათ.

<u>ექსტრემალურ პირობებში მზარდი ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა</u>

უკანასკნელ პერიოდში დიდი ყურადღება ეთმობა ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების კვლევას, რაც იმით არის განპირობებული, რომ ისინი წარმოადგენენ საინტერესო ობიექტს, როგორც სამეცნიერო მიზნებისათვის, ასევე პრინციპულად ახალი ბიოტექნოლოგიების შექმნისათვის. ამის გამო ძალიან აქტუალურია ექსტრემოფილური მიკროოგანიზმების სელექცია. კვლევის შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ კოლექციაში არსებული მიკრომიცეტების ექსტრემოფილობის ხარისხი. გამოყოფილ კოლექციაზე სრული წარმოდგენის შექმნის მიზნით დავადგინეთ ყველა გამოყოფილი კულტურის (და არა მხოლოდ ფერმენტების პროდუცენტების) ექსტრემოფილობის ხარისხი.

თავდაპირველად შევისწავლეთ ტემპერატურის გავლენა კულტურების ზრდა-განვითარებაზე. ოპტიმალური ტემპერატურის დასადგენად აღნიშნული კულტურებს ვზრდიდით 5-დან - 50^{0}C-მდე, 5^{0}C-ის ინტერვალით, საწყის საკვებ არეში. ტემპერატურულ ოპტიმუმად ვთვლიდით იმ ტემპერატურას რომელზეც მიკრომიცეტების კულტურების ნაზრდი მაქსიმალური იყო, რაც ისაზღვრებოდა კოლონიის დიამეტრის ზომით და ზრდის სიჩქარით. ამ გზით შესწავლილ იქნა ყველა მიკროსკოპული სოკოს 351 კულტურა.

კულტურების ზრდის ოპტიმალური pH-ის დასადგენად ცალკეულ შტამებს ვზრდიდით pH-2,0 დან pH-10,0 მდე 0,5 ერთეულის ინტერვალით. საწყის საკვებ არეში pH-ის ოპტიმუმად ასევე მიღებული იყო კულტურების მაქსიმალური ზრდის უნარი, რომელიც ისაზღვრებოდა კოლონიის დიამეტრის ზრდის სიჩქარით.

ჰალოფილური კულტურების გამოვლენის მიზნით კულტურებს ვზრდიდით საკვებ არეზე, რომელშიც შეგვქონდა NaCl სხვადასხვა კონცენტრაციით (0,5M - 4,0M-მდე).

ამრიგად, დავადგინეთ ფერმენტების პროდუცეტი და არა პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხი, რამაც საშუალება მოგვცა შეგვექმნა ექსტრემოფილური (თერმო-, აციდო-, ალკალი- და ჰალოფილური) მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია, რომელიც მოიცავს 234 კულტურას. უნდა აღინიშნოს, რომ ჩვენს მიერ შექმნილი ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია ერთადერთია საქართველოში. მე-3 ცხრილში წარმოდგენილია სხვადასხვა კრიტიკულ პირობებში ზრდის უნარის მქონე არაპროდუცენტი კულტურების რაოდენობა. სავარაუდოა, რომ ეს შტამები გამოიჩენენ თავს სხვა მეტაბოლიტების დაგროვებისას ან რომელიმე ტიპის კონვერსიის განხორციელების პროცესში. მე-4 ცხრილში და მე-3 ნახაზზე წარმოდგენილია ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკრომიცეტების ექსტრემოფილური კულტურების რაოდენობა, მე-5 ცხრილში კი შეჯამებულია ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების საერთო რაოდენობა.

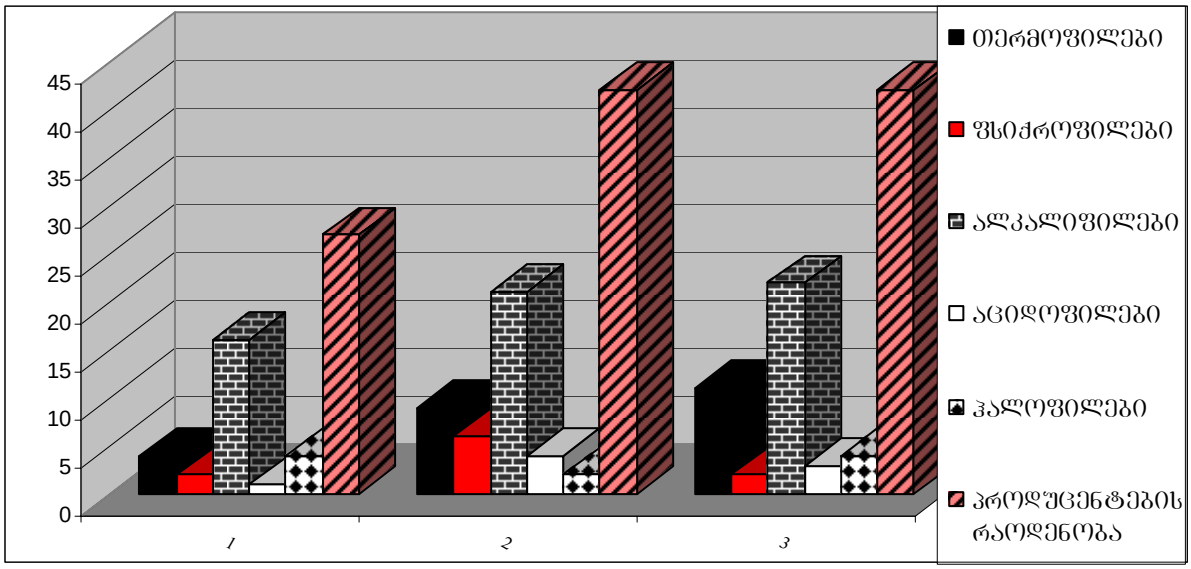
ცხრილი. 3.
მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილური კულტურები

მიკროსკოპული სოკოები	თერმო ფილები	ფსიქრო ფილები	ალკალი ფილები	აციდო ფილები	ჰალო ფილები	კულტურების საერთო რაოდენობა
სხვადასხვა ზონებიდან გამოყოფილი კულტურები	43	22	63(6)	15	4(12)	147

ცხრილი. 4.
ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი - ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოები

№		თერმო ფილები	ფსიქრო ფილები	ალკალ იფილე ბი	აციდო ფილებ ი	ჰალოფ ილები	პროდუცენტებ ის რაოდენობა	კულტურები ს რაოდენობა
1	α-ამილაზას პროდუცენტები	4	2	16	1	1(3)	27	24
2	გლუკოამილაზას პროდუცენტები	8(1)	6	14(7)	4	2(1)	43	34
3	ცელულაზას პროდუცენტები	11	(2)	15(7)	1(2)	2(2)	42	29
7	პროდუცენტების რაოდენობა	24	10	59	8	11	112	
8	კულტურების რაოდენობა	23	8	45	6	5		87

ფრჩხილებში მოცემულია კულტურების ის რაოდენობა რომლებიც უკვე აღნიშნულია,როგორც სხვა ფერმენტის პროდუცენტი ან ექსრტრემოფილი სხვა ნიშნის მიხედვით



ნახაზი 3.
ფერმენტების პროდუცენტი ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოები:

1. α-მილაზას პროდუცენტები;
2. გლუკოამილაზას პროდუცენტები;
3. ცელულაზას პროდუცენტები.

ცხრილი. 5.
ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია

გამოყოფის წყარო	მიკროსკოპული სოკოები	ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკრ. სოკოები	ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიკრ. სოკოები	კულტურების საერთო რაოდენობა
სხვადასხვა ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონები	ფერმენტების პროდუცენტები	56	87	143
	არაპროდუცენტი კულტურები	61	147	208
	მიკროსკოპული სოკოების საერთო რაოდენობა	117	234	351

ჩვენს მიერ მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ყველა ნიადაგობრივ-კლიმატურ ზონაში არსებობს ტემპერატურის მიმართ განსხვავებულად მგრძნობიარე მიკროსკოპული სოკოები, ხოლო კავკასიის ყველაზე ცხელი რეგიონიდან (სიღნაღი) 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.

კარბოჰიდრაზების – ექსტრემოფილურ პროდუცენტებს შორის, შემდგომი კვლევისათვის შევარჩიეთ საძიებელი ფერმენტების აქტიური პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები, რომლებიც წარმოდგენილია მე-6 ცხრილში.

ცხრილი 6.
უჯრედგარე ფერმენტების აქტიური პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოები

№	კულტურა	კულტურის დახასიათება			
	α-ამილაზას პროდუცენტები				α-ამილაზას აქტიობა, ერთ/მლ
1	*Aspergillus* sp. S 54'	თერმოფილი	ალკალიფილი	ექსტრემ. ჰალოფილი	1,2
2	*Aspergillus* sp. R 5	მეზოფილი	ალკალიფილი		2.5
3	*Aspergillus* sp. S 16	მეზოფილი		ზომ. ჰალოფილი	3.0
4	*Aspergillus niger* B47	მეზოფილი	აციდოფილი		4.5
5	*Aspergillus oryzae* B27	მეზოფილი		ზომ.. ჰალოფილი	9.0
6	*Mucor* sp. T 37	ფსიქროტოლერანტი			2.0
7	*Rhizopus* sp. S 75	მეზოფილი	ალკალიფილი		4.5
8	*Penicillum* sp. S 80	მეზოფილი	ალკალიფილი	ზომ. ჰალოფილი	2.0
9	*Penicillum* sp. T 25	ფსიქროფილი		ექსტრემ. ჰალოფილი	0.8
10	*Mortierella* sp. S 34	ფსიქროფილი			0.6
	გლუკო ამილაზას პროდუცენტები				გლუკო ამილაზას აქტიობა, ერთ/მლ

1	*Aspergillus* sp. S 60	თერმოტოლერანტი		ზომიერი ჰალოფილი	3.3
2	*Aspergillus* sp. S 58	თერმოფილი			4.5
3	*Chaetomium* sp. S 77	თერმოფილი	ალკალიფილი		14.6
4	*Aspergillus* sp. T 31	თერმოფილი	ალკალიფილი	ექსტრემ. ჰალოფილი	7.5
5	*Penicilium* sp. S35	ფსიქროფილი		ექსტრემ. ჰალოფილი	8.3
6	*Trichoderma* sp. P 7	თერმოტოლერანტი			12.0
7	*Trichoderma* sp. P 10	მეზოფილი	ალკალიფილი		11.2
8	*Mortierella* sp. K 33	ფსიქროფილი			3.75
9	*Cladosporium* sp. T 48	თერმოფილი,	ალკალიფილი		15.0
10	*A. awamori* S 11	მეზოფილი			15.0
11	*A. awamori* T 23	მეზოფილი			25.0
12	*Penicillum sp.* P 5	მეზოფილი			2.5
13	*Aspergillus niger* M 8	მეზოფილი		ექსტრემ. ჰალოფილი	14.5
	ცელულაზას პროდუცენტები				**საერთო ცელულაზური აქტიობა, ერთ/მლ**
1	*Aspergillus* sp. S 60	თერმოტოლერანტი		ზომიერი ჰალოფილი	0.5
2	*A. versicolor* S83	თერმოფილი			1.2
3	*A. terreus* T39	თერმოფილი			0.4
4	*Chaetomium* sp. S 77	თერმოფილი			0.3
5	*Sporotrichum purverulentum* B 7	თერმოფილი			0.3
6	*Sporotrichum purverulentum* B43	თერმოფილი			0.4
7	*Mucor* sp. T 54	თერმოტოლერანტი	ალკალიფილი		0.3
8	*Absidia* sp. K 61	თერმოტოლერანტი	ალკალიფილი	ექსტრემ. ჰალოფილი	0.65
9	*Penicillum* sp. S 4	თერმოფილი			0.2
10	*Penicillum* sp. S 10	ფსიქროფილი		ექსტრემ. ჰალოფილი	0.15
11	*Penicillum* sp. T 25	მეზოფილი			0.5
12	*Rizhopus* sp. R 22	მეზოფილი			0.75
13	*Chaetomium* sp. P36	მეზოფილი	ალკალიფილი		0.3

მიკოტოქსიკოლოგიური გამოკვლევების გზით დავადგინეთ, რომ, შერჩეული კულტურები არიან არაპათოგენურები და არატოქსიკურები. ეს კი საშუალებას იძლევა მიღებული შტამები გამოყენებულ იქნას სამრეწველო დანიშნულებით. შესაბამისი შემოწმების შემდეგ, ამ კულტურების გამოყენება შესაძლებელია ისეთ დარგებში, როგორიცაა მედიცინა და კვების მრეწველობა.

ბუნებრივი ფაქტორები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ მიკროორგანიზმების ცვალებადობაზე, რის შედეგადაც წარმოიქმნება აქტიური ფორმები, რომლებიც განსხვავებულად იწვევენ განსაზღვრული სუბსტრატის ტრანსფორმაციას. ამიტომ შემდეგომ ეტაპზე, აქტიური პოდუცენტების ბიოსინთეზის გაზრდის მიზნით, მოვახდინეთ საკვები არეების ოპტიმიზაცია და დავადგინეთ სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური პირობები.

<u>ფერმენტების პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოების საკვები არეების ოპტიმიზაცია და კულტივირების პირობების შერჩევა</u>

მიკროორგანიზმების მეტაბოლური აქტივობა და ფერმენტების სინთეზი დიდად არის განპირობებული ოპტიმალური საკვები არის შერჩევით: ნახშირბადის, აზოტისა და ფოსფორის წყაროებით და მათი თანაფარდობით. მაგრამ, განსაკუთრებული როლი მიკროორგანიზმების ბიოსინთეზის პროცესში, მაინც მიეკუთვნება ნახშირბადის წყაროს. სწორედ ნახშირბადის წყაროს საშუალებით ხდება ფერმენტების ინდუქცია და შემდგომი სინთეზის რეგულაცია.

ამილაზების პროდუცენტებისათვის ნახშირბადის წყაროებად გამოიყენებოდა სახამებელი და ხორბლის ქატო 6%-ის ოდენობით, დისაქარიდები ა-1,4 და ა-1,6 გლიკოზიდური ბმებით (მალტოზა, საქაროზა) და ზოგიერთი მონოსაქარიდი, არაბინოზა - ნახშირბადის მიხედვით 0,8%-ის ოდენობით. გლუკოამილაზას და α-ამილაზას მაღალი აქტივობა აღინიშნებოდა, როდესაც ნახშირბადის წყაროდ გამოიყენებოდა სახამებელი და მალტოზა. შემდეგ დავადგინეთ შერჩეული ნახშირბადის წყაროს_სახამებლის, ოპტიმალური კონცენტრაცია. უჯრედგარე ა-ამილაზას მაქსიმალური დაგროვება ხდებოდა 9% სახამებლის, გლუკოამილაზას კი 6% სახამებლის შემცველ საკვებ არეებზე, შესაბამისი კულტურების გაზრდისას.

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.

დადვადგინეთ საძიებელი ფერმენტების ყველა აქტიური შტამებისათვის ოპტიმალური აზოტის წყარო. ამ კულტურებისათვის ასევე დადგენილია ფოსფორის წყაროს ოპტიმალური ფორმა. ამისათვის აღებული იქნა შემდეგი მარილები: ერთჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა ნატრიუმი და ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა ამონიუმი, ერთ და ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმი.

აღნიშნული ფერმენტების მეზოფილურ და ექსტრემოფილურ პროდუცენტ კულტურებს, საკვები არეების ოპტიმიზაციის შემდეგ, ვზრდიდით შემდეგი შემადგენლობის არეებზე:

ა-ამილაზას მისაღებად შერჩეულია თხიერი არე, რომლის შემადგენლობაა%: სახამებელი-9,0, $NaN0_3$-0,34, KH_2PO_4-0,1, $MgSO_4.7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4.H_2O$ -0,0002, ალაოს ღივები-2,0 100მლ-ზე. (pH-5,5-6,0)

გლუკოამილაზას მისაღებად შერჩეულია სინთეზური თხიერი არე, რომლის შემადგენლობაა%: სახამებელი-6,0, NH_4N0_3-0,84, KH_2PO_4-0,1, $MgSO_4.7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4.H_2O$ -0,0002, ალაოს ღივები-3,0 100მლ-ზე. (pH-5,5-6,0)

ცელულაზას მისაღებად - თხიერი არე, რომლის შემადგენლობაა%: მიკროკრისტალური ცელულოზა-0,1, $NaN0_3$-0,3, KH_2PO_4-0,2, $MgSO_4.7H_2O$-0,05, სიმინდის ექსტრაქტი-1,5. ცელულაზას პროდუცენტებისათვის საწყისი საკვები არე ოპტიმალური აღმოჩნდა. (pH-5,5-6,0)

მიკრომიცეტების სიღრმულ კულტივირებას ვაწარმოებდით აღნიშნული მეთოდით 750 მლ-იან ერლენ-მეიერის კონუსურ კოლბაში, სანჯღრეველაზე 180-200 ბრ/წთ პირობებში.

მართალია, თითოეული ფერმენტის პროდუცენტი სამ-სამი კულტურით იყო წარმოდგენილი, მაგრამ ჩატარებული კვლევების შედეგები საშუალებას იძლევა, შერჩეული საკვები არეები თითქმის ყველა მიკროსკოპული სოკოს კულტურისათვის, მათი სიღრმული კულტივირებისას, მისაღებად ჩაითვალოს. (ცხ.7)

ვინაიდან, მიკროორგანიზმების ზრდისა და ფიზიოლოგიური აქტივობის გამოვლენისათვის ტემპერატურა ყველაზე მნიშვნელოვანი ფაქტორია, პირველ რიგში შევისწავლეთ ტემპერატურის გავლენა ამა თუ იმ კულტურის მიერ პროდუცირებული ფერმენტის ბიოსინთეზზე.

ფერმენტების აქტიური პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურის გათვალისწინებით, მათ სიღრმულ კულტივირებას ვაწარმოებდით სხვადასხვა ტემპერატურაზე; კერძოდ, თერმოფილების კულტივირება მიმდინარეობდა 30^0C-ის ზევით 55^0C-მდე, ფსიქროფილების 5^0C-დან 30^0C-ის ჩათვლით, 5^0 C –ის ინტერვალით.

ასევე, მიკროორგანიზმების ფიზიოლოგიურ აქტიურობაზე დიდ გავლენას ახდენს საკვები არის pH. ამ შემთხვევაშიც მხედველობაში მივიღეთ აღნიშნული კულტურების ზრდისათვის ოპტიმალური წყალბადიონთა კონცენტრაცია. კერძოდ, ალკალიფილების კულტივირება მიმდინარეობდა pH-6,0-დან pH-11,0-ის ჩათვლით. აციდოფილების კი pH-2,0-დან pH-6,5-ის ჩათვლით, 0,5 pH-ის ინტერვალით.

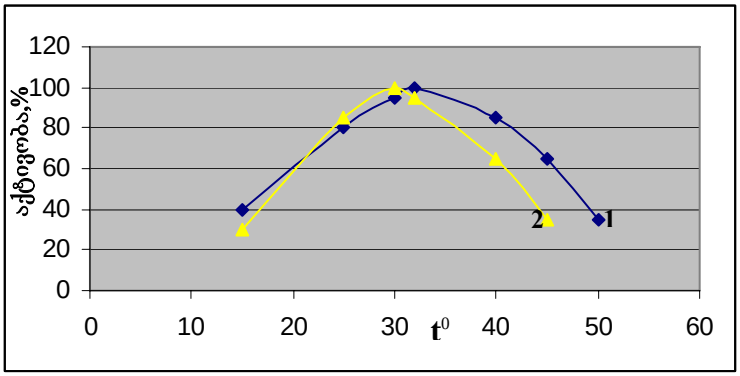
ცხრილი 7.
სელექციურად შერჩეული კარბოჰიდრაზების აქტიური პროდუცენტები

№	კულტურა	კულტურების მიერ პროდუც. ფერმენტები	აქტიურობები, ერთ/მლ	კულტურების ექსტრემოფილობა
1	*Aspergillus niger* B47	α-ამილაზა	4.5	აციდოფილი
2	*Aspergillus oryzae* S27	α-ამილაზა	9.0	მეზოფილი, ზომიერი ჰალოფილი
3	*Aspergillus niger* S54'	α-ამილაზა	2,5	თერმოფილი, ალკალიფილი, ექსტრემალური ჰალოფილი
4	*Cladospoirum* sp.T48	გლუკოამილაზა	15.0	თერმოფილი, ალკალიფილი
5	*Aspergillus awamori* T 23	გლუკოამილაზა	25.0	მეზოფილი
6	*Aspergillus niger* M8	გლუკოამილაზა	14.5	ექსტრემალური ჰალოფილი
7	*Aspergillus versicolor* 83	ცელულაზა	1.2	თერმოფილი
8	*Rizhopus* sp.R22	ცელულაზა	0.75	მეზოფილი
9	*Absidia* sp.K61	ცელულაზა	0.65	თერმოტოლერანტი, ალკალიფილი, ექსტრემალური ჰალოფილი

მეზოფილური და ექსტრემოფილური შტამების მიერ პროდუცირებული ფერმენტების მოქმედებების შედარების მიზნით, α-ამილაზას პროდუცენტებს შორის

დავადგინეთ აციდოფილური – *Aspergillus niger* B-47 და მეზოფილი აქტიური პროდუცენტის *Aspergillus oryzae* B-27 კულტივირების პირობები. აღმოჩნდა, რომ კულტურა – *Aspergillus niger* B-47 მაღალ - α-ამილაზურ აქტივობას ამჟღავნებს 32^{0}C-ზე, ხოლო კულტურა - *Aspergillus oryzae* B-27 - 30^{0}C-ზე (ნახაზი 4). ასევე, დავადგინეთ ამ კულტურების ზრდის ოპტიმალური pH, რადგან კულტურა - *Aspergillus niger* B-47 – აციდოფილია, სიღრმულ კულტივირებას ვაწარმოებდით არეში, რომლის pH 2,0-დან pH 6,5-მდე იცვლებოდა. კულტურა ყველაზე დიდი რაოდენობით ა-ამილაზას წარმოქმნის pH 3-3,7-ზე. უფრო მჟავე არისკენ გადახრის შემთხვევაში აქტივობა რამდენადმე მცირდება, pH 6,0-ზე ნარჩენი აქტივობის მხოლოდ 25%-ია და ნეიტრალურ pH-ზე აქტივობა პრაქტიკულად 0-ს უტოლდება. (ნახ. 5)

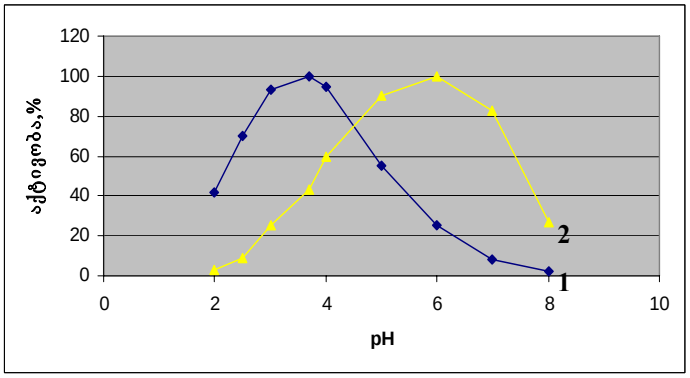
ნახ. 4.
ტემპერატურის გავლენა α-ამილაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



<u>კულტურები:</u> 1. *A. niger* B47, 2. *A. oryzae* B27

<u>ცდის პირობები:</u> ტემპერატურა იცვლებიდა 20^0-დან 50^0-მდე, 5^0-ის ინტერვალით; საკვები არის pH-ი – 5..0

ნახ. 5.
pH-ის გავლენა α-ამილაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას

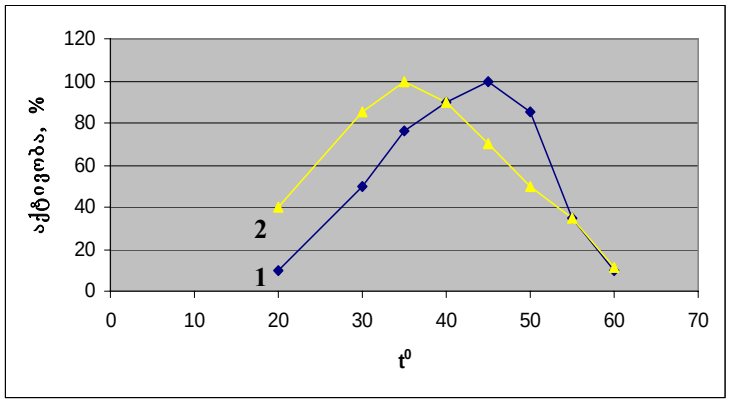


<u>კულტურები:</u> 1. *A. niger* B47, 2. *A. oryzae* B27

<u>ცდის პირობები:</u> ტემპერატურა – 32^0; საკვები არის pH-ი იცვლებოდა 2.0-დან – 8-მდე, 0.5 ინტერვალით

გლუკოამილაზას პროდუცენტებს შორის დავადგინეთ კულტურების - *Cladosporium* T-48 (თემოფილი) და *Aspergillus awamori* T-23 (მეზოფილი) სიღრმული კულტივირების პირობები. აქედან, პირველი კულტურა საინტერესო იყო იმით, რომ ერთდროულად არის ალკალიფილი და თერმოფილი. (ნახ. 6, 7)

ნახ. 6. ტემპერატურის გავლენა გლუკოამილაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას

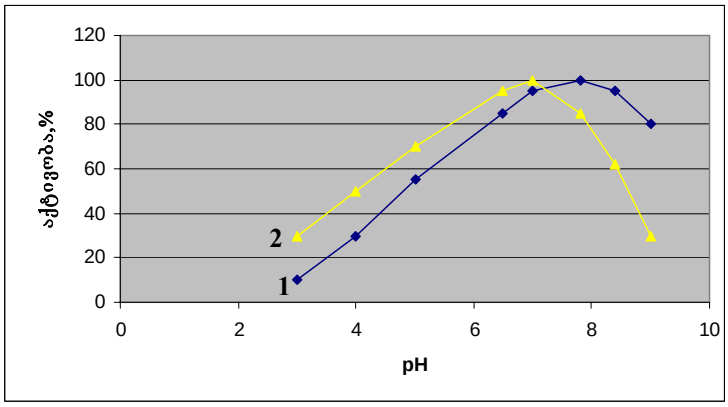


<u>კულტურები:</u>

1. *Cladosporium* sp.T 48
2. *A. awamori* T 23

<u>ცდის პირობები:</u> ტემპერატურა იცვლებიდა 20^0-დან 60^0-მდე, 5^0-ის ინტერვალით;
საკვები არის pH-ი – 5.5

ნახ. 7. pH-ის გავლენა გლუკოამილაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



<u>კულტურები:</u>

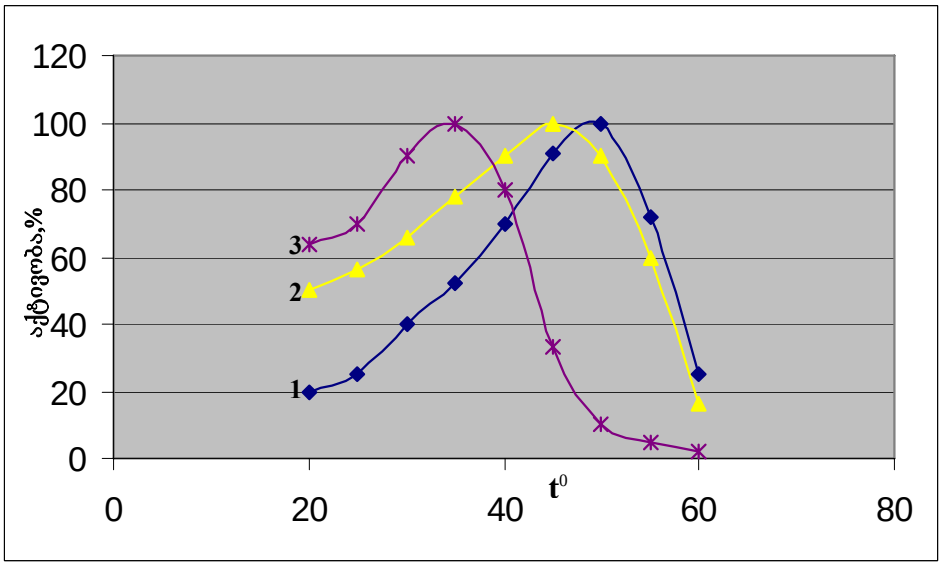
1. *Cladosporium* sp.T 48
2. *A. awamori* T 23

<u>ცდის პირობები:</u> ტემპერატურა – 35^0;
საკვები არის pH-ი იცვლებოდა 3.5-დან – 11-მდე, 0.5 ინტერვალით

ცელულაზას პროდუცენტებს შორის დადგენილია ყველაზე აქტიური შტამების *Aspergillus versicolor* S-83-ის (თერმოფილი). *Absidia* sp. K-61-ის (ალკალიფილი და ჰალოფილი), და მეზოფილური კულტურის *Rizopus* sp. R-22-ის კულტივირების პირობები.

თერმოფილი კულტურის *Aspergillus versicolor* S-83-ის სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური ტემპერატურა უდრის 50^0C. თერმოტოლერანტი კულტურის *Absidia* sp. K-61-ის სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური ტემპერატურა არის 45^0C. ამ მონაცემზე დაყრნობით ეს კულტურა შეიძლება ჩაითვალოს თერმოტოლერანტად. კულტურა *Rizopus* sp. R-22 -ის ოპტმალური ტემპერატურაა 35^0C.(ნახ. 8)

ნახ. 8
ტემპერატურის გავლენა ცელულაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



<u>კულტურები:</u>

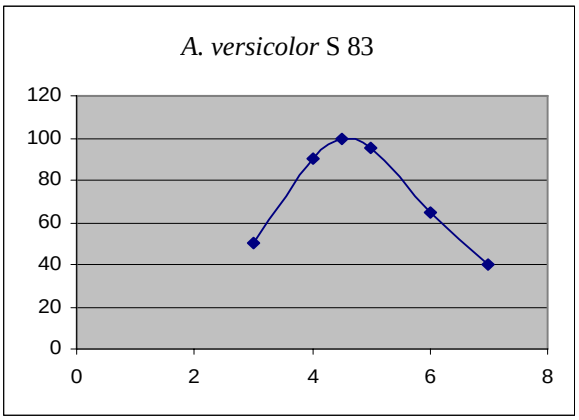
1. *A. versicolor* S 83
2. *Absidia* sp. K61
3. *Rizhopus* sp. R22

<u>ცდის პირობები:</u> ტემპერატურა იცვლებიდა 20^0-დან 60^0-მდე, 5^0-ის ინტერვალით;
საკვები არის pH-ი – 5..5

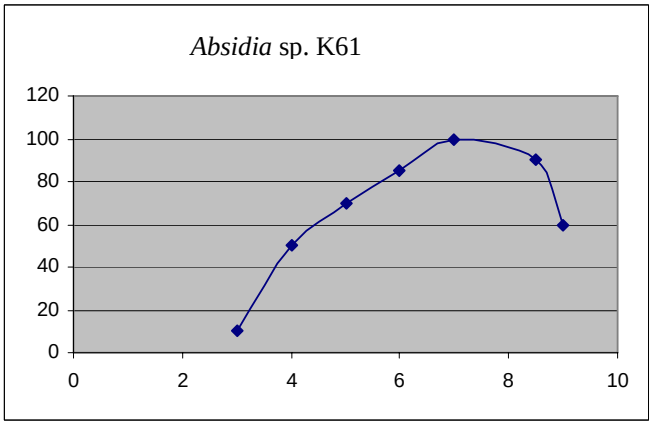
Aspergillus versicolor S-83-ისათვის ოპტიმალური pH-4,5-ია, *Absidia* sp. K-61-ის - pH-7,0, *Rizopus* sp. R 22-ის - pH-6,0 (ნახ. 9)

ნახ. 9

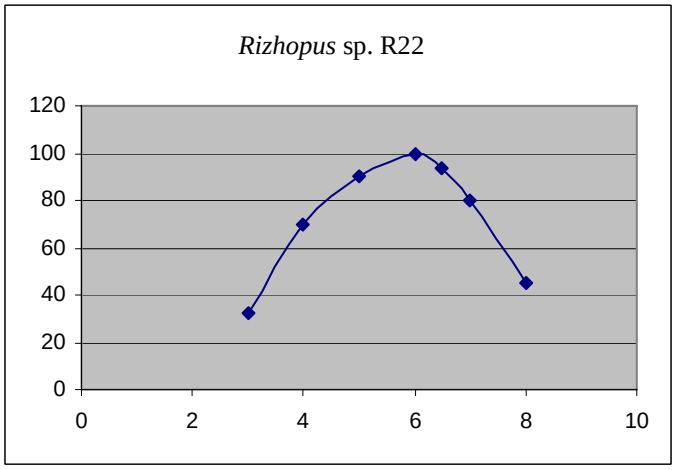
ა) pH-ის გავლენა *A. versicolor* S 83 ცელულაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



ბ) pH-ის გავლენა *Absidia* sp. K61 ცელულაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



გ) pH-ის გავლენა *Rizhopus* sp. R22 ცელულაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



<u>კულტურები:</u>

1. *A. versicolor* S 83
2. *Absidia* sp. K61
3. *Rizhopus* sp. R22

<u>ცდის პირობები:</u> ტემპერატურა – 40^0;
საკვები არის pH-ი იცვლებოდა 3.0-დან – 11-მდე, 0.5 ინტერვალით

აღსანიშნავია, რომ, უმეტეს შემთხვევაში, თერმოფილების ტემპერატურის ოპტიმუმი სიღრმული კულტივირებისას შეადგენს 40^0-45^0C, ხოლო მეზოფილეური კულტურებისათვის _ 30^0-35^0C. მიკროსკოპული სოკოების სიღრმულ კულტივირებაზე pH-ის გავლენის შესწავლამ გვიჩვენა რომ, ალკალიფილების pH ოპტიმუმი pH-7,0-ზე უფრო მეტია ტუტიანობის არეში, აციდოფილების კი უფრო ხშირად მერყეობს pH 3,0 დან pH 4,5 მდე.

კულტივირების პირობების შერჩევისას, ასევე დიდი მნიშვნელობა აქვს სიღრმული კულტივირების ხანგრძლივობის დადგენას და ჩასათესი მასალის ასაკს. მიკრომიცეტებისათვის ოპტიმალურია 72-96სთ (72სთ – ამილაზების (α-ამილაზა, გლუკოამოლაზა) პროდუცენტებისათვის, 96სთ – ცელულაზის პროდუცენტებისათვის).

ჩასათესი მასალის ოპტიმალურ ასაკს ამილაზებისათის წარმოადგენდა 9-დღიანი, ხოლო ცელულაზებისათვის _ 10 დღიანი კულტურის კონიდიების სუსპენზია.

ცხრილი 8.
ჰიდროლიზური ფერმენტების აქტიური პროდუცენტები

№	კულტურა	კულტურების მიერ პროდუც. ჰიდროლიზური ფერმენტები	საწყისი აქტივიობები ერთ/მლ	აქტივობები, ერთ/მლ ოპტიმალური პირობების შემდეგ	აქტივობები, ერთ/მლ საკვები არეების ოპტიმიზაციის შემდ	ფერმენტების გაზრდილი აქტივიობები %-ში
1	*Aspergillus niger* B47	α-ამილაზა	4.5	5,7	6,4	42
2	*Aspergillus oryzae* S27	α-ამილაზა	9.0	9,8	11.0	22
3	*Aspergillus niger* S54	α-ამილაზა	2,5	2,5	3,2	28
4	*Cladospoirum* sp. T48	გლუკო-ამილაზა	15.0	21,0	25,0	66
5	*Aspergillus awamori* T23	გლუკო-ამილაზა	25.0	32,0	32	28
6	*Aspergillus niger* M8	გლუკო-ამილაზა	14.5	14.5-	16,0	10
7	*Aspergillus versicolor* S83	ცელულაზა	1.2	1,4	1,4	16
8	*Rizhopus* sp.R22	ცელულაზა	0.75	0.75	0,75	0
9	*Absidia* sp.K61	ცელულაზა	0.65	0,75	0,75	15

აღნიშნული შტამების საკვები არეების ოპტიმიზაციისა და ოპტიმალური პირობების დადგენით გაიზარდა საწყისი აქტივობები (ცხ. 8). კერძოდ, ა-ამილაზას პროდუცენტების - .*Aspergillus niger* B47, *Aspergillus oryzae* B27, *Aspergillus niger* S54 -ის აქტივობები შესაბამისად გაიზარდა 42%, 22% და 28%-ით. გლუკოამილაზას პროდუცენტების - *Cladosporium* sp. T48, *Aspergillus awamori* T 23 –ის აქტივობები გაიზარდა 66% და 28%-ით. ცელულაზას პროდუცენტების - *Aspergillus versicolor* S83, *Absidia* sp. K 61-ის აქტივობები გაიზარდა 16% და 15%-ით.

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

<u>ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი ფერმენტული პრეპარატების დახასიათება.</u>

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 თუნდაც მარტივი დახასიათება.

საკვლევი ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატის მიღებისას გამოვიყენეთ საერთო სქემა. კერძოდ, აღნიშნული კულტურების სიღრმული კულტივირების შედეგად მიღებულ სითხეს ვფილტრავდით, შემდეგ კულტურალურ სითხეს ვაციებდით (4^{0}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 75-90% ცელულაზების და ამილაზების ფერმენტული პრეპარატები. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია ცხრილში N9, სადაც მოცემულია კულტურალური სითხისა და ორგანული გამხსნელების ის მოცულობითი შეფარდებები, რომლებიც აქტივობის მიხედვით მაქსიმალურ გამოსავალს იძლეოდნენ. ცხრილიდან ჩანს, რომ ყველა ფერმენტის ტექნიკური პრეპარატის მიღებისათვის საუკეთესო ორგანული გამხსნელია ეთილის სპირტი. გამოყოფილი ფერმენტული პრეპარატების აქტივობები, შესაბამისად, გამოისახებოდა ერთეულებში შეფარდებით 1 გრამ მშრალ პრეპარატზე. (გლუკოამილაზა-5860 ერთ/გ; α-ამილაზა – 1928 ერთ/გ; ცელულაზა – 320 ერთ/გ).

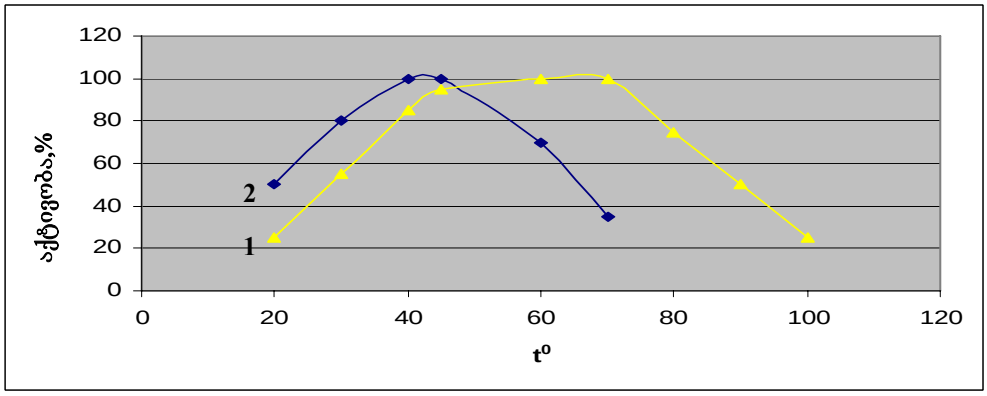
ცხრილი 9.
მიკროსკოპულისოკოების კულტურალური ფილტრატებიდან ფერმენტების დალექვა ორგანული გამხსნელებით

№	ორგანული გამხსნელები	შეფარდება ხსნარის გამხსნელთან	α-ამილაზას გამოსავლიანობა%	შეფარდება ხსნარის გამხსნელთან	გლუკოამილაზას გამოსავლიანობა%	შეფარდება ხსნარის გამხსნელთან	ცელულაზას გამოსავლიანობა%
1	ეთილის სპირტი	1:3	75	1:3,5	82	1:4	80
2	აცეტონი	1:2,5	30	1:2	45	1:2	60
3	იზოპროპა-ნოლი	1:1,5	45	1:1	62	1:1	55

შემდგომ ეტაპზე დავადგინეთ მიღებული ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმები. ამისთვის ფერმენტულ პრეპარატების აქტივობებს ვზომავდით საინკუბაციო არის 20^{0}C დან 80^{0}C-ის ინტერვალში სტანდარტული მეთოდით და გამოვსახავდით პროცენტებში. ამილაზებისა და ცელულაზების ოპტიმუმების დადგენისას ფერმენტული პრეპარატები იხსნებოდა 0,05 M აცეტატურ ბუფერში, pH 4,7. ამილაზების შემთხვევაში სუბსტრატი იყო 1%- იანი სახამებლის ხსნარი იგივე ბუფერულ სისტემაში.

ა-ამილაზას პროდუცენტებს შორის საკვლევად აღებული იყო თერმოფილური - *Aspergillus niger* S-54 და მეზოფილური შტამები *Aspergillus oryzae* B-27.-ის მიერ პროდუცირებული ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატები. თერმოფილური შტამის ა-ამილაზას მაქსიმალური აქტივობა ჰქონდა 70^{0}C –ზე, ხოლო მეზოფილური შტამისას_ 45^{0}C-ზე. (ნახ. 10).

ნახაზი 10.
ტემპერეტურის გავლენა α-ამილაზას ფერმენტულ აქტივობაზე

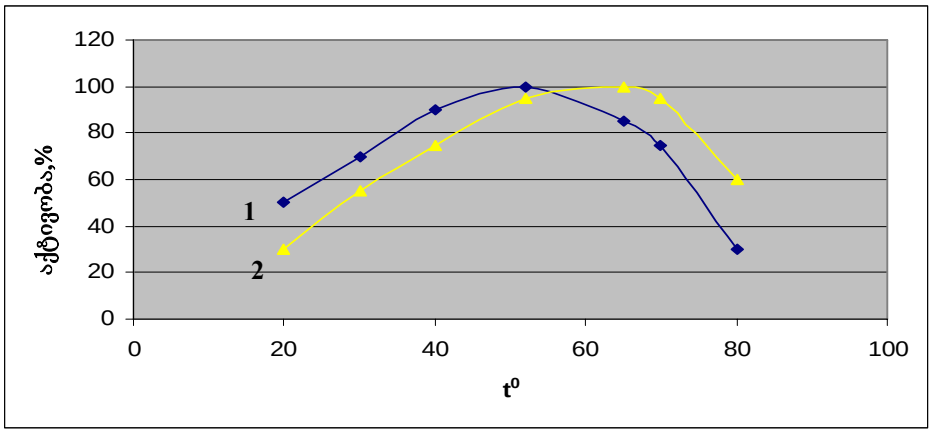


შტამები:
1. *A. niger* S 54
2. A. oryzae B 27

<u>ცდის პირობები:</u> აცეტატური ბუფერი 0.05 M, pH 4.7; სუბსტრატი 1%-იანი სახამებლის ხსნარი.
<u>ინკუბაციის ხანგრძლივობა:</u> 10 წთ

გლუკოამილაზას პროდუცენტებს შორის შედარებისათვის აღებულ იქნა თერმოფილური - *Cladosporium* sp. T-48 და მეზოფილური კულტურები *Aspergillus awamori* T-23. მათ მიერ წარმოქმნილი ფერმენტების ტექნიკურ პრეპარატებზე ტემპერატურის გავლენის შესწავლით დადგინდა, რომ გლუკოამილაზას თერმოფილური პროდუცენტის ტემპერატურული ოპტიმუმია 65^{0}C, მეზოფილური პროდუცენტის ტემპერატურული ოპტიმუმი უდრის 55^{0}C-ს. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია მე-11 ნახაზზე.

ნახაზი 11
ტემპერეტურის გავლენა გლუკოამილაზას ფერმენტულ აქტივობაზე

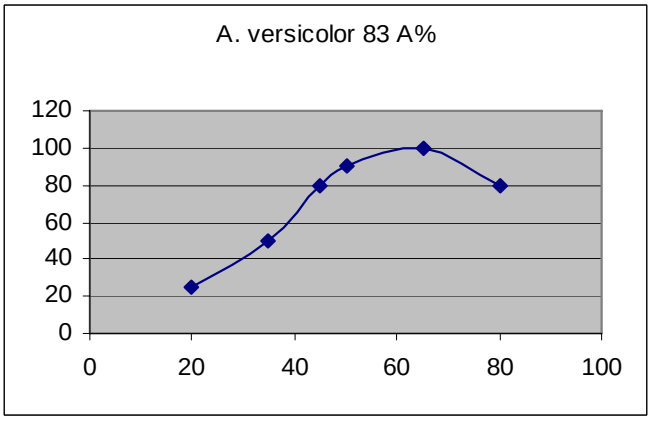


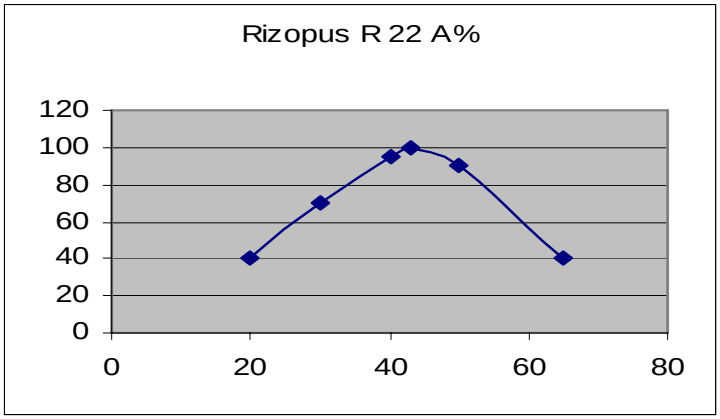
შტამები:
1. *A. awamori* T 23
2. *Cladosporium* sp. T 48
<u>ცდის პირობები:</u>
აცეტატური ბუფერი 0.05 M, pH 4.7; სუბსტრატი 1%-იანი სახამებლის ხსნარი.
<u>ინკუბაციის ხანგრძლივობა:</u> 10 წთ

თერმოფილური და მეზოფილური შტამების მიერ პროდუცირებული ცელულაზების შესადარებლად, შესწავლილ იქნა ამ ფერმენტის პროდუცენტები - *Aspergillus versicolor* S-83 და *Rizopus* sp R-22.ტემპერატურული ოპტიმუმის დადგენამ აჩვენა რომ, თერმოფილური კულტურის - *Aspergillus versicolor* S-83 -ის ცელულაზა მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებს 65^{0}ჩ-ზე, მაშინ როცა მეზოფილური კულტურის- *Rizopus* sp. R-22-ის ცელულაზას ტემპერატურული ოპტიმუმია -50^{0}ჩ.(ნახ. 12-ა,ბ).

ნახაზი 12
ტემპერეტურის გავლენა ცელულაზას ფერმენტულ აქტივობაზე

ა) ბ)





A. versicolor 83 *Rizopus* sp. R 22

<u>ცდის პირობები:</u> აცეტატური ბუფერი 0.05 M, pH 4.7;
სუბსტრატი ფილტრის ქაღალდი
ინკუბაციის ხანგრძლივობა: 60 წთ

ფერმენტების მოქმედების pH ოპტიმუმების გამოვლენის მიზნით საინკუბაციო არის pH იცვლებიდა 2,0-დან 10,0-მდე. პარალელურად ვადგენდით იმ ფერმენტული პრეპარატების pH ოპტიმუმებსაც, რომლებიც არ არიან მიღებული აციდო ან ალკალიფილი შტამებისაგან. მიღებული შედეგები ნაჩვენებია მე-8 ცხრილში.

ცხრილი 10. კარბოჰიდრაზების მოქმედებების pH ოპტიმუმები

ფერმენტული პრეპარატები	პროდუცენტები	pH ოპტიმუმი
α-ამილაზა	*A. niger* S 54	7.0
	A. niger B 47	3.0
გლუკოამილაზა	*Cladosporium* sp. T 48	7.5
ცელულაზა	*A. versicolor* S 83	3.5
	Absidia sp. K 61	8.2

როგორც ცხრილიდან ჩანს, აციდოფილური კულტურების ფერმენტების pH ოპტიმუმები მჟავე არეშია, ალკალიფილური კულტურების ფერმენტები კი მაღალ აქტიურობას ტუტე არეში ამჟღავნებენ. განსაკუთრებულად აღსანიშნავია *Aspergillus versicolor* S-83, რომლის სიღრმული კულტივირების pH ოპტიმუმი 6,0-ის ტოლია, ხოლო მის მიერ პროდუცირებული ფერმენტის მოქმედების pH ოპტიმუმი 3,5-ს უდრის. ეს შედეგი კიდევ ერთხელ ადასტურებს ლიტერატურაში არსებულ ინფორმაციებს, რომ აციდოფილური და ალკალიფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH ხშირად არ შეესაბამება გარემოს მჟავიანობას (Lengworthy, 1981) .

ამდენად, ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები ყოველთვის არ არიან ექსტრემოფილური ფერმენტების პროდუცენტები და პირიქით.

<u>დასკვნები:</u>

1. შექმნილია კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია, რომელიც მოიცავს 351 კულტურას. კოლექციაში არსებული კულტურები ეკუთვნიან შემდეგ გვარებს: *Aspergillus, Penicillium, Mucor, Rizopus, Trichoderma, Trichothecium, Fusarium, Botritus, Absidia, Mortierella*, *Petromyces, Sporotrichum, Cladosporium, Chaetomium* და *Helminosporium*. დადგენილია მიკროორანიზმების გამოყოფის რეგიონებში ბინადარი მიკროსკოპული სოკოების დომინანტი გვარები.

2. დადგენილია კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხი, რის საფუძველზეც შექმნილია ექსტრემოფილური სოკოების კოლექცია. ეს კოლექცია მოიცავს 234 კულტურას. კულტურები გამოკვლეულია ჰიდროლიზური ფერმენტების ბიოსინთეზის უნარზე.ექსტრემოფილურ კულტურებს შორის გამოვლენილია α-ამილაზას -27, გლუკოამილაზას -43 და ცელულაზას -42 პროდუცენტი შტამი. აღსანიშნვია, რომ 17 კულტურა ხასიათდება ორ-ორი ფერმენტის პროდუცირების უნარით., ხოლო 25 კულტურა ექსტრემოფილია ორი ნიშნის მიხედვით. საბოლოოდ გამოვლენილია ჰიდროლიზური ფერმენტების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების 87 კულტურა.

3. გამოვლენილია α-ამილაზას აქტიური პროდუცენტები ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების 27 კულტურას შორის. სკრინინგის გზით შერჩეულია α-ამილაზას აქტიური პროდუცენტი _ აციდოფილი-*A. niger* B47 და თერმოფილი-*A. niger* S54 _ სოკოები. დადგენილია, რომ აღნიშნული შტამები არატოქსიური და არაპათოგენურია.

4. გამოვლენილია გლუკოამილაზას აქტიური პროდუცენტები ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების 43 კულტურას შორის. სკრინინგის გზით შერჩეულია გლუკოამილაზას აქტიური პროდუცენტი – თერმოფილი-*Cladosporium* sp. T48 და ჰალოფილი-*Aspergillus niger* M8 _ სოკოები. დადგენილია, რომ აღნიშნული შტამები არატოქსიური და არაპათოგენურია.

5. გამოვლენილია ცელულაზას აქტიური პროდუცენტები ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების 42 კულტურას შორის. სკრინინგის გზით შერჩეულია ცელულაზის აქტიური პროდუცენტი - თერმოფილი *A. versicolor* S83 და ალკალიფილი *Absidia* sp. K61 _ სოკოები. დადგენილია, რომ აღნიშნული შტამები არატოქსიური და არაპათოგენურია.

6. მეზოფილური და ექსტრემოფილური შტამების მიერ პროდუცირებული ფერმენტების მოქმედებების შედარების მიზნით დადგენილია ფერმენტების (α-ამილაზა, გლუკოამილაზა, ცელულაზა) აქტიური პროდუცენტი მეზოფილი და ექსტრემოფილი შტამების ზრდის ოპტიმალური პირობები და საკვები არის შემადგენლობა. ოპტიმალური პირობების დადგენით, საკვები არეების შემადგენელი კომპონენტების ოპტიმიზაციით შტამების მიერ წარმოქმნილი ფერმენტების აქტივობები გაზრდილია 15%-დან 66%-მდე.

7. დამუშავებულია შერჩეული შტამების ფილტრატებიდან ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატების მიღების მეთოდი. დადგენილია მიღებული ფერმენტული პრეპარატების pH და ტემპერატურული ოპტიმუმები; დადგენილია, რომ თერმოფილი შტამების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმები უფრო მაღალ ტემპერატურაზეა, მეზოფილურ ანალოგებთან შედარებით.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული ნაშრომების სია

1. Iashvili T., Zakariashvili N., Burduli T., Kutateladze L. Conversion of Cellulose-Containing Wastes by *Chaetomium thermophile* T-1 into Protein-Rich Biomass. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, V,169 №1, pp.141-143, 2004.

2. Urushadze T., Khvedelidze R., Berulava A., Chkhartishvili D., Burduli T. Study of substrate specifity of endo-1,4-β glucanases from Thermophilic Micromycetes. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, V.170, N1, pp.164-165, 2004.

3. Daushvili L., Zakariashvili N., Kutateladze L., Jobava M., Iashvili T., Burduli T. Screening of Microscopic Fungi of Aspergillus Grnus under the extremal conditions for the purpose of Cellulase producers revaling. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, V.170, N1, pp.166-168, 2004.

4. Daushvili L., Kutateladze L., Burduli T., Jobava M., Dzalamidze I., Aleksidze T., Tinikashvili L. Isolation of Microscopic Fungi from Various Regions of Georgia, *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences. Biol. ser. B.* Vol. 2, No. 5-6, pp. 68-73, 2004.

5. Zakariashvili N., Kutateladze L., Iashvili T., Burduli T., Glonti N. Halophilic Microscopic Fungi from Soils of Humid-Subtropical, Continental and Subalpine Climatic Zones of Georgia. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, V.173, N1, pp.157-160, 2006.

6. L. Daushvili, L. Kutateladze, T. Burduli, M. Jobava, R. Kvedelidze. Acidophilic and Alkaliphilic Microscopic fungi izolated from Soils of Diferent Regions of Georgia. *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences. Biol. ser. B.* Vol. 4, No. 2, pp. 89-92, 2006.

L.Daushvili, L. Kutateladze, T. Burduli, M. Jobava, I.Dzalamidze, T.Urushadze, T. Aleksidze.
Halopilic Micromycetes from Diferent Soil-climatic zones of Georgia. Buiietin of the Georgian Academy of sciences 2005 (inpress)

L.Daushvili, L. Kutateladze, T. Burduli, M. Jobava, R. Kvedelidze.
Acidophilic and Alkaliphilic Microscopic fungi from Soils of Diferent Regoins of Georgia. Proc. Georgian Acad. Sci 2005 (inpress)

T.Urushadze, R. Kvedelidze, L. Kutateladze, T. Burduli, L.Daushvili, D. Chkhartishvili.
Microscopic fungi from Veriust Regions of Georgia - Producents of Hydrolising Enzymes. Proc. Georgian Acad. Sci 2005 (inpress)