

Mikroskopinių grybų, išskirtų iš gamtinės aplinkos, produkuojamų celiuliazinių aktyvumo tyrimai

Ieva Sendžikaitė¹,

Dalia Čizeikienė¹,

Vita Raudonienė²,

Algimantas Paškevičius²

¹ Kauno technologijos universitetas,
Radvilėnų pl. 19
50254 Kaunas, Lietuva
El. paštas ieva.sendzikaite@ktu.edu

² Gamtos tyrimų centras,
Biodestruktorių tyrimo laboratorija,
Akademijos g. 2,
08412 Vilnius, Lietuva

Pastaruoju metu didelio susidomėjimo sulaukė augalinės kilmės žaliavos perdirbimas į vertingus komponentus pakeičiant šalutinius žemės ir miško ūkio produktus į pridėtinę vertę turinčias medžiagas. Celiuliazės fermentai yra svarbūs skaidant augalinės kilmės žaliavą, iš jų ir celiuliozę, kuri yra gausiausias augalų biomasės komponentas, kuris gali būti panaudojamas įvairių bioproduktų, įskaitant biokurą, gamybai. Aktuali išlieka naujų, celiuliazės gaminančių mikroskopinių grybų, išskirtų iš gamtinės aplinkos, paieška ir jų savybių tyrimai. Šiame tyrime vertinant specifinę sąveiką tarp kongo raudonojo dažo ir polisacharidų, iš 29 skirtingų mikroskopinių grybų, išskirtų iš gamtinės aplinkos, buvo atrinkta 11 padermių, kurios pasižymėjo celiuliaziniu aktyvumu. Tyrimai atlikti Gamtos tyrimų centro Biodestruktorių tyrimų laboratorijoje ir Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedroje 2017–2018 metais. Didžiausias celiuliazinis aktyvumas kviečių sėlenų terpėje buvo nustatytas mikroskopinių grybų, priklausančių *Penicillium* sp. genčiai. Šių grybų gaminamų celiuliazinių optimali temperatūra ir terpės pH vertė – 50 °C ir pH 7.

Raktažodžiai: *Penicillium*, mikroskopiniai grybai, celiuliazinis aktyvumas, kviečių sėlenos

ĮVADAS

Kiekvienais metais žmonių skaičius Žemėje auga, todėl didėja buitinių, žemės ūkio bei maisto pramonės šalutinių perdirbimo produktų kiekis. Viena iš šalutinių produktų rūšių yra sausa augalų dalis – lignoceliuliozė. Lignoceliuliozės biomasę sudaro įvairios žemės ūkio atliekos (šiaudai, žievė, stiebai, koteliai), lapuočių ir spygliuočių mediena, miesto atliekos (popierius, kartonas, medienos gaminiai), popieriaus bei kartono pramonės atliekos, žolinės atliekos. Pagrindiniai lignoceliuliozinės žaliavos komponentai yra celiuliozė (35–50 %), hemiceliuliozė (20–35 %) ir ligninas (10–25 %). Dėl tokio didelio celiuliozės kiekio, esančio lignoceliuliozėje žaliavoje, yra ieškoma būdų, kaip būtų ga-

lima efektyviai ją perdirbti iki fermentuojamų sacharidų. Tam galima naudoti tradicinius cheminius būdus – apdorojimą rūgštimis, šarmais, vandenilio peroksidu ar kt. Tačiau galima naudoti alternatyvų būdą – celiuliozę skaidančius fermentus – celiuliazės (Čizeikienė et al., 2018). Celiuliozės skaidymas yra kompleksinis procesas, kuriame dalyvauja keli fermentai. Celiuliazė yra sinergetinis fermentas, priklausantis hidrolazių klasei ir skaidantis celiuliozę į gliukozę ir / arba į skirtingus oligosacharidus. Celiuliazės yra skirstomos į tris pagrindines grupes: endogliukanazė (endo-1, 4-β-gliukanazė EC 3.2.1.4) atsitiktinai skaldo β-1,4-glikozidinius ryšius; celobiohidrolazė arba egzogliukanazė (egzo-1,4-β-gliukanazė EC 3.2.1.91) veikia redukuotus arba neredukuotus celiuliozės grandinės galus,

atpalaiduodamos celobiozę arba gliukozę, ir β -gliukozidazė (1, 4- β -gliukozidazė EC 3.2.1.21) hidrolizuoja tirpius celodekstrinus ir celobiozę iki gliukozės (Gao et al., 2008).

Celiuliazės plačiai paplitę gamtoje ir yra randamos augaluose, vabzdžiuose, jas gamina bakterijos bei grybai (Watanabe, Tokuda, 2010; Duan, Feng, 2010). Dažniausiai pramonėje naudojamos celiuliazės yra atskirų fermentų mišinys, gaunamas iš grybų, ypač iš *Trichoderma* ar *Aspergillus* genčių.

Celiuliazės gaminantys mikroskopiniai grybai turi nemažai privalumų, pavyzdžiui, gaunama didelė šių fermentų išeiga (Phitsuwan et al., 2007). Grybai, tokie kaip *Penicillium*, *Acremonium* ir *Chrysosporium*, produkuoja didelius kiekius šių fermentų (Gusakov, 2011).

Celiuliazinių gamybai taikomą fermentaciją galima suskirstyti į dvi grupes: skystafazę, kuri yra pagrįsta mikroorganizmų kultivavimu skystoje terpėje (Cherry, Fidantsef, 2003), ir kietafazę, kai mikrobiologinis augimas ir produkto gamyba vyksta ant kieto paviršiaus (Peilin, Liming, 2001), o vandens nėra arba jo kiekis yra minimalus, žinoma, substratas turi turėti drėgmės, kuris užtikrintų mikroorganizmų augimą (Pandey, 2003).

Kietafazės fermentacijos būdas tampa patrauklesnis (Varnaitė ir kt., 2011) dėl ekonomiško gaminant celiuliazes. Mikroorganizmai, ypač grybų kultūros, pagamina didelius kiekius šių fermentų, nes fermentacijos būdas yra panašus į mikroorganizmų natūralią aplinką (Peilin, Liming, 2001). Grybai, tokie kaip *T. reesei*, *A. niger*, *Penicillium* sp., buvo parinkti celiuliazinių gamybai naudojant kietafazę fermentaciją. D. S. Chanas (1985) nustatė, kad auginant *T. reesei* kietafazės fermentacijos sąlygomis jo produkuojamų celiuliazinių išeiga buvo didesnė nei auginant skystafazės fermentacijos sąlygomis. Vėliau celiuliazinių gamyba buvo palyginta naudojant skystafazę ir kietafazę fermentacijas (Tengerdy, 1996). Rezultatai parodė, kad naudojant kietafazę fermentaciją gamybos kaina sumažėjo 10 kartų (Singhania et al., 2006; Vintila et al., 2009).

Procesas priklauso nuo daugybės veiksnių, pavyzdžiui, substrato apdorojimo ir dalelių dydžio, terpės sudėties, jos sterilizacijos, drėgmės kiekio, temperatūros, terpės pH vertės, maišymo intensyvumo, aeracijos. Kietafazės fermentacijos parametru optimizavimas gali dar labiau pagerinti

ti gamybos ekonomišumą ir taip padidinti šio proceso patrauklumą celiuliazinių gamybai (Singhania et al., 2009).

Pasitelkus celiuliazes, išskirtas iš mikroorganizmų / grybų, galima sumažinti tradicinių cheminių metodų naudojimą pramonėje bei perdirtinti atliekas, turinčias lignoceliuliozės, ir naudoti bioproduktų gamyboje. Tokiu būdu pagaminti bioproduktai ar biokuras yra nekenksmingi aplinkai, nes gamybos procese naudojami atsinaujinantys šaltiniai.

Dėl šių priežasčių yra svarbu tirti mikroorganizmus ir jų produkuojamas celiuliazes, ieškoti aktyvių celiuliazinių producentų padermių bei parinkti optimalias sąlygas, kad šie fermentai pasižymėtų didžiausiu aktyvumu, nes skirtingos mikroskopinių grybų padermės pasižymi skirtingu celiuliaziniu aktyvumu (Varnaitė ir kt., 2008).

Darbo tikslas – ištirti naujai išskirtų mikroskopinių grybų gaminamų celiuliazinių aktyvumą ir nustatyti fermentinės hidrolizės sąlygų įtaką jų aktyvumui.

METODAI IR SĄLYGOS

Celiuliazės gaminantys mikroskopiniai grybai buvo atrenkami iš mikroskopinių grybų kolekcijos, esančios Gamtos tyrimų centre, Biodestruktorių tyrimų laboratorijoje (Vilnius). Tikrintos 29 skirtingos mikroskopinių grybų padermės. Iš pradžių jie buvo persėti į mėgintuvėlius su salyklo ekstrakto terpe ir kultivuoti šešias paras 26 ± 1 °C temperatūroje. Vėliau mikroskopiniai grybai pasėti į Petri lėkšteles su minimalia agarizuota terpe, kurioje vienintelis anglies šaltinis yra 0,5 % karboksimetilceliuliozė (KMC). Po šešių parų kultivavimo 26 ± 1 °C temperatūroje buvo tikrinamas celiuliazinis aktyvumas naudojant kongo raudonąjį dažą.

Kokybinis celiuliazinio aktyvumo nustatymo metodas remiasi specifine sąveika tarp kongo raudonojo (angl. *Condo red*) dažo ir polisacharidų. Kongo raudonasis reaguoja su β -1,4-gliukanais, sukeldamas pastebimą raudonos spalvos pasikeitimą. Ant Petri lėkštelių su celiuliozės terpe užauginti mikroorganizmai buvo užpilti 3 ml 0,1 % vandeninio kongo raudonojo tirpalu, palaikyta 20 minučių, po to dažas nupiltas ir užpilta 1 M NaCl tirpalu. Dar po 20 minučių druskos tirpalas nupiltas ir celiuliazinis aktyvumas nustatytas

pagal šviesiai oranžinės spalvos zoną aplink mikroskopinio grybo koloniją.

Tirti mikroskopiniai grybai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Mikroskopiniai grybai

Table 1. *Fungi*

Mikroskopinio grybo pavadinimas / <i>Fungi</i>
<i>Cladosporium</i> sp. X1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> X2
<i>Aureobasidium pullulans</i> X3
<i>Mycelia sterilia</i> NB 6a
<i>Mycelia sterilia</i> NB 7a
<i>Talaromyces luteus</i> X4
<i>Cladosporium lignicola</i> X5
<i>Penicillium brevicompactum</i> X6
<i>Penicillium</i> sp. A1
<i>Myrothecium verrucaria</i> X7

Mikroskopinių grybų sporoms skaičiuoti buvo naudojama Gorajajeva kamera. Sporų skaičius (a) nustatytas kvadratuose, kurių tūris yra $0,00025 \text{ mm}^3$, kiekis mililitre (x) buvo apskaičiuotas pagal formulę:

$$x = \frac{a}{2,5 \times 10^{-7}}. \quad (1)$$

Kiekybinis celiuliazinio aktyvumo nustatymas buvo atliktas naudojant dinitrosalicilo rūgšties reagentą. Mikroskopiniai grybai pasėti ($2,8 \times 10^5$ sporų/ml) ant kviečių sėlenų ir distiliuoto vandens terpės (santykis 1 : 5, mišinys, prieš pasėjant grybus autoklavuotas $121 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 15 min.), buvo kultivuoti 12 parų termostate $25 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Po auginimo gautas mišinys praskiestas vandeniu santykiu 1 : 4, centrifuguotas (8 000 aps./min., 10 min.). Gautas centrifugatas (fermento tirpalas) naudotas celiuliaziniam aktyvumui tirti.

Celiuliaziniam aktyvumui nustatyti kaip substratas naudoti KMC milteliai, jie ištirpinti $0,1 \text{ M}$ citratiniame buferyje (pH 5), paruoštas 1% KMC tirpalas. Į $0,9 \text{ ml}$ 1% KMC tirpalo, pašildyto iki $50 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūros, vandens vonioje įpilta $0,1 \text{ ml}$ tiriamo fermento tirpalo. Kontrolinis mėginys ruoštas sumaišius $0,9 \text{ ml}$ 1% KMC tirpalo ir $0,1 \text{ ml}$ citratinio buferio. Fermentinės hidrolizės

reakcija vykdyta $50 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 60 min. Reakcija sustabdyta mėgintuvėlius ištraukus, staigiai atvėsinus ir įpylus 1 ml DNS reagento ($1 \pm 0,01 \text{ g}$ 3,5-dinitrosalicilo rūgšties ir $30 \pm 0,1 \text{ g}$ natrio-kalio tartrato ištirpinta 100 ml $0,4 \text{ M}$ NaOH tirpale), turinys gerai sumaišytas ir mėgintuvėliai pamerkti į verdančio vandens vonią bei kaitinti 5 min. Po kaitinimo nedelsiant atvėsinti, praskiesti 6 ml distiliuoto vandens, sumaišyti ir spektrofotometru (Genesys 10 UV) matuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Celiuliazinis aktyvumas išreikštas aktyvumo vienetais mililitre (AV/ml) ir apskaičiuotas pagal 2 formulę. Vienas fermento aktyvumo vienetas gali išskirti $1 \text{ } \mu\text{mol}$ gliukozės ekvivalento iš celiuliozės filtro popieriaus per 1 min. , esant tam tikroms analizės sąlygoms.

Nustatant celiuliazinį aktyvumą sudaryta standartinė gliukozės tiesė ($0,278$; $0,55$; $1,11$; $1,66$; $2,22$; $2,77$; $5,55 \text{ } \mu\text{mol/ml}$), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio gliukozės ekvivalento vertė. Spektrofotometru (Genesys 10UV) nustatyta gliukozės įvairios koncentracijos mėginių šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais, matuojant 540 nm bangos ilgyje. Gliukozės ekvivalento vertės μmol tiriamuose tirpaluose apskaičiuotos iš standartinės gliukozės tiesės.

$$\text{AV/ml} = 60 \frac{\text{GEV} \times \text{PF}}{2,5 \times 0,1}, \quad (2)$$

GEV – gliukozės ekvivalento vertė standartinėje tiesėje, μmol ; PF – praskiedimo faktorius; 60 – fermentinės hidrolizės trukmė, min.; 0,1 – fermento kiekis reakcijos mišinyje, ml.

Dviejų mikroskopinių grybų, kurių celiuliazinis aktyvumas buvo didžiausias, t. y. *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2, nustatyta celiuliazinių aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros ir terpės pH. Matuojant celiuliazinio aktyvumo priklausomybę nuo temperatūros mėgintuvėliai su reakcijos mišiniu buvo pamerkti į skirtingų temperatūrų vandens vonias ($20 \text{ }^\circ\text{C}$; $30 \text{ }^\circ\text{C}$; $40 \text{ }^\circ\text{C}$; $50 \text{ }^\circ\text{C}$; $60 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūros). Vertinant terpės pH verčių įtaką celiuliaziniam aktyvumui, buvo ruošti skirtingų pH verčių ($2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$) buferiai.

Ekperimentai kartoti tris kartus, iš gautų rezultatų išvesti vidurkiai ir apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai naujant Excel programinę įrangą.

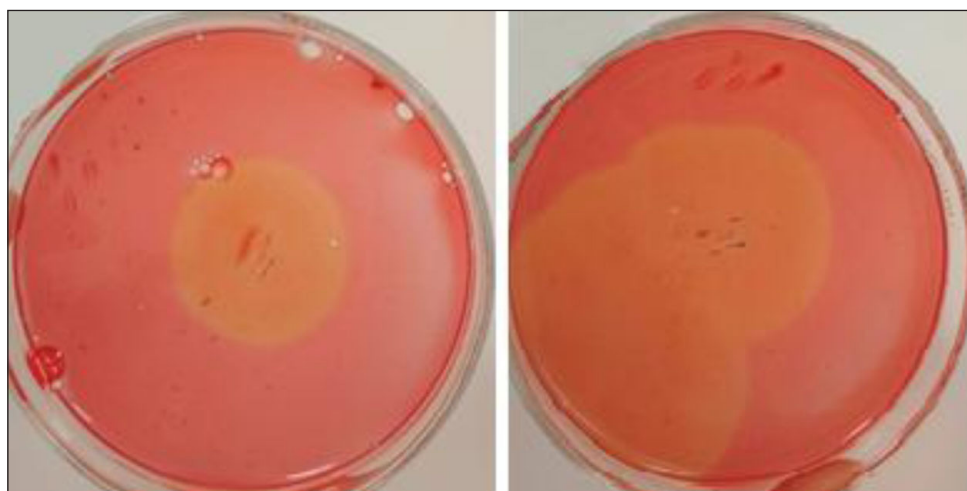
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Įvairių mikroskopinių grybų celiulazių aktyvumas

Vertinant specifinę sąveiką tarp kongo raudonojo dažo ir polisacharidų buvo patikrintas 29 grybų celiulazinis aktyvumas po jų auginimo Petri lėkštelėse, kur kaip vienintelis anglies šaltinis buvo naudojama chemiškai susintetinta celiuliozė. Specifinė kongo raudonojo ir polisacharidų sąveika po mikroskopinių grybų *Penicillium* sp. A1 ir *Talaromyces luteus* X4 auginimo ant celiuliozės pateikta 1 paveiksle.

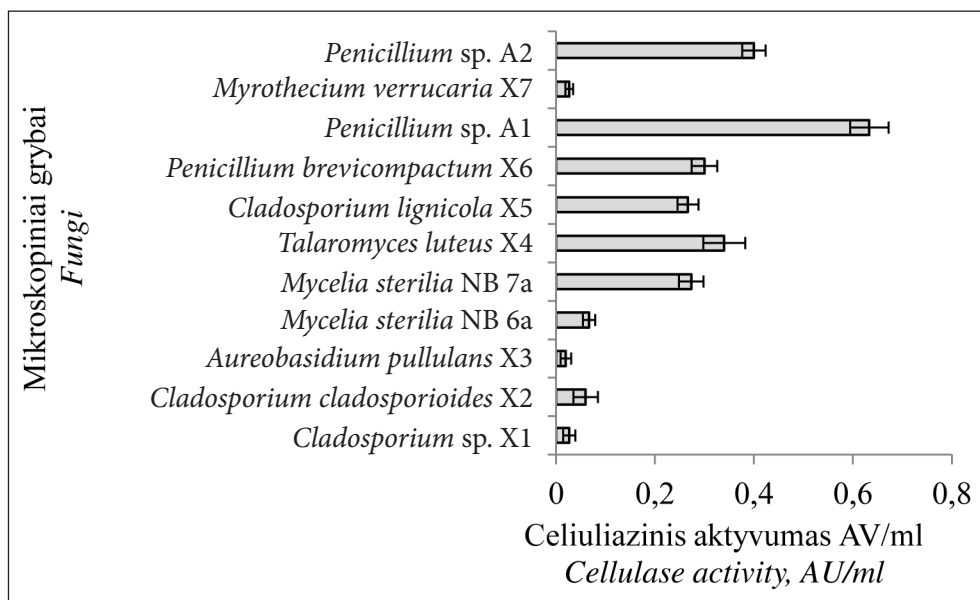
Kongo raudonasis reaguoja su β -1,4-gliukanais, sukeldamas pastebimą raudonos spalvos pasikeitimą. Ar mikroskopiniai grybai gamina celiulazes, nustatyta pagal šviesiai oranžinės spalvos zoną aplink mikroskopinio grybo koloniją. Atlikus kongo raudonojo testą atrinkta 11 potencialių celiulazes gaminančių mikroskopinių grybų, kurių šviesiai oranžinės spalvos zona aplink mikroskopinio grybo koloniją buvo didžiausia (nuo 5 iki 9 mm).

Vienuolikos atrinktų mikroskopinių grybų celiulaziniai aktyvumai (AV/ml), nustatyti kviečių sėlenų terpėje po 12 parų auginimo, pateikti 2 paveiksle. Mažiausiu celiulaziniu aktyvumu pasižymėjo



1 pav. *Penicillium* sp. A1 (kairėje) ir *Talaromyces luteus* X4 (dešinėje) celiulazinio aktyvumo zonos

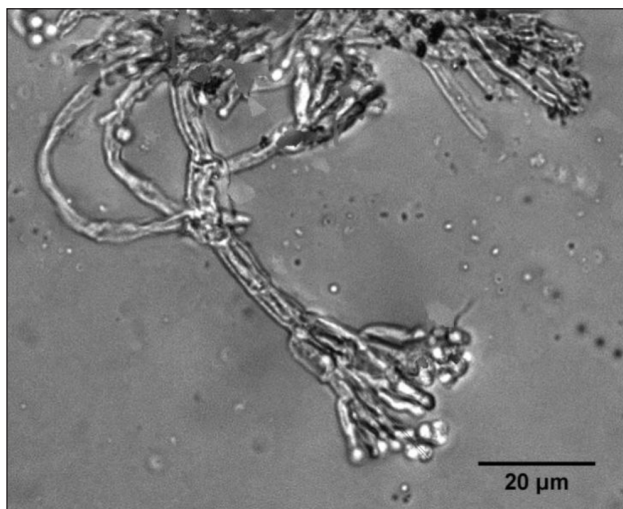
Fig. 1. Zones of CMC hydrolysis are visible. *Penicillium* sp. A1 on the left and *Talaromyces luteus* X4 on the right



2 pav. Mikroskopinių grybų celiulazinis aktyvumas (AV/ml) kviečių sėlenų terpėje po 12 parų auginimo 25 °C temperatūroje

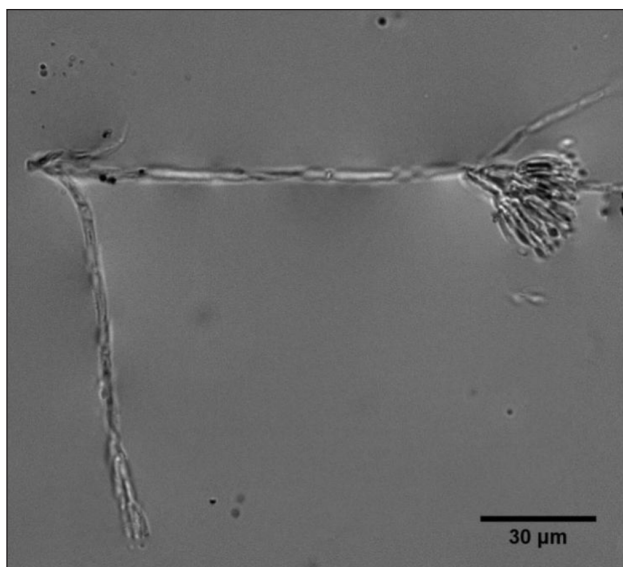
Fig. 2. Cellulase activity (AU/ml) of 11 isolated fungi after 12-day cultivation in the wheat bran medium at 25°C

Cladosporium sp. X1, *Aureobasidium pullulans* X3 ir *Myrothecium verrucaria* X7. Didžiausiu celiuliaziniu aktyvumu sėlenų terpėje pasižymėjo *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2 genties mikroskopiniai grybai, kurių celiuliazinis aktyvumas šioje terpėje buvo atitinkamai 0,63 AV/ml ir 0,4 AV/ml. *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2 grybų mikroskopinis vaizdas po 14 parų auginimo pateiktas 3 ir 4 paveiksluose.



3 pav. *Penicillium* sp. A1 mikroskopinis grybas po 14 parų auginimo salyklo terpėje esant 25 °C

Fig. 3. *Penicillium* sp. A1 after 14 days of incubation on the malt extract medium at 25°C temperature

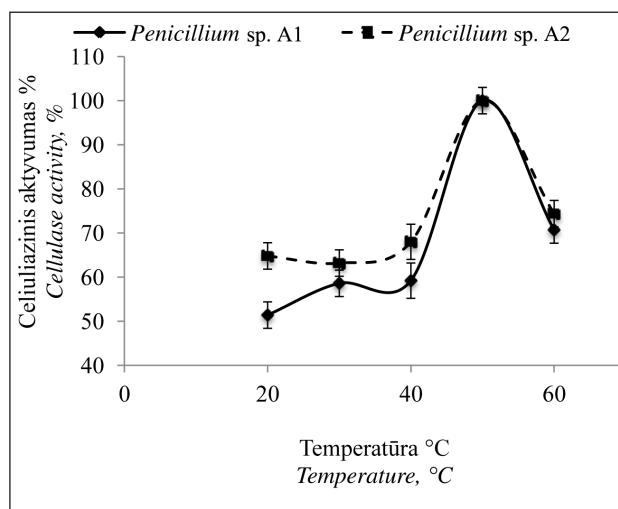


4 pav. *Penicillium* sp. A2 mikroskopinis grybas po 14 parų auginimo salyklo terpėje esant 25 °C

Fig. 4. *Penicillium* sp. A2 after 14 days of incubation on the malt extract medium at 25°C temperature

Temperatūros įtaka mikroskopinių grybų celiuliaziniam aktyvumui

Atrinkus didžiausiu celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjusius mikroskopinius grybus – *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2, nustatyta fermentinės hidrolizės sąlygų (temperatūros ir terpės pH verčių) įtaka jų celiuliaziniam aktyvumui. Temperatūros įtaka celiuliazinių aktyvumui pateikta 5 paveiksle.



5 pav. Temperatūros įtaka *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2 celiuliazinių aktyvumui

Fig. 5. The effect of temperature on *Penicillium* sp. cellulase activity

Abu mikroskopiniai grybai didžiausiu celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo esant 50 °C temperatūrai (100 %). Kai temperatūra siekė 20 °C, celiuliazinis aktyvumas *Penicillium* sp. A1 sudarė 51,4 % nuo didžiausio aktyvumo, o *Penicillium* sp. A2 – 64,8 %. Celiuliazinis aktyvumas didėjo didėjant temperatūrai, o pasiekęs 50 °C pradėjo mažėti ir esant 60 °C temperatūrai sudarė 70,7 % *Penicillium* sp. A1 ir 74,7 % *Penicillium* sp. A2.

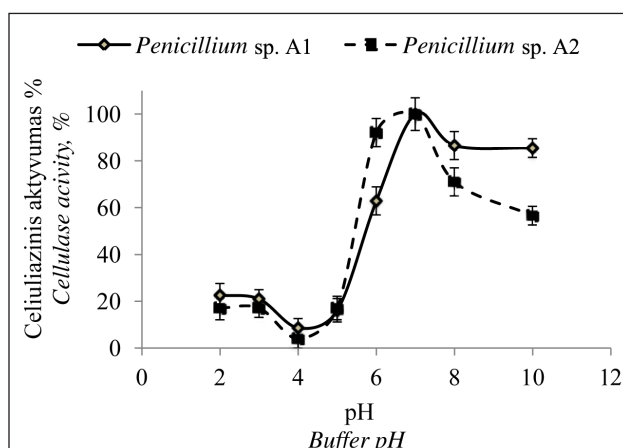
Gauti duomenys patvirtino R. Saini ir kt. (2015) rezultatus. Mokslininkai irgi tyrė *Penicillium* genties mikroskopinius grybus ir nustatė, kad didžiausias celiuliazinis aktyvumas pasireiškė esant 50 °C temperatūrai. A. M. de Castro ir kt. (2010) tyrė *Penicillium funiculosum* grybo gaminamas celiuliazes. Jų rezultatai atskleidė, kad optimali temperatūra celiuliaziniam aktyvumui yra apie 52 °C.

pH įtaka mikroskopinių grybų celiulaziniams aktyvumui

Nustatyta fermentinės hidrolizės terpės pH verčių įtaka *Penicillium* sp. mikroskopinių grybų celiulaziniams aktyvumui (6 pav.).

Abu *Penicillium* genties mikroskopiniai grybai didžiausiu aktyvumu pasižymėjo esant pH 7. Aktyvumas nuo pH 2 iki pH 4 mažėjo, žemiausias aktyvumas nustatytas esant pH 4, kuris sumažėjo 14 % *Penicillium* sp. A1 ir 13 % *Penicillium* sp. A2. Toliau didėjant terpės pH vertėms aktyvumas augo, o pasiekęs pH 7 vertę pradėjo mažėti. Esant pH 10 aktyvumas *Penicillium* sp. A1 sumažėjo 15 %, o *Penicillium* sp. A2 sumažėjo 43 %.

T. Dutta ir kt. (2008) tyrė *Penicillium citrinum* mikroskopinių grybų produkuojamas celiulazes ir nustatė, kad šio mikroorganizmo celiulazinis aktyvumas didžiausias yra tada, kai terpės pH vertės svyruoja nuo 5,5 iki 8. Šie duomenys sutampa su rezultatais, gautais mūsų tyrime.



6 pav. pH įtaka *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2 celiulazinių aktyvumui

Fig. 6. The effect of buffer pH on *Penicillium* sp. cellulase activity

IŠVADOS

1. Tirti 29 mikroskopiniai grybai, iš kurių 11 pasižymėjo celiulaziniu aktyvumu. Nustatyta, kad didžiausias aktyvumas (0,62 AV/ml ir 0,4 AV/ml) buvo *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2 genties mikroskopinių grybų, išskirtų iš gamtinės aplinkos.

2. *Penicillium* sp. A1 ir *Penicillium* sp. A2 genties mikroskopinių grybų, augintų ant kviečių

sėlenų terpės, didžiausias celiulazinis aktyvumas buvo esant 50 °C temperatūrai ir pH 7.

Gauta 2018 11 21

Priimta 2018 12 12

LITERATŪRA

1. Chanal D. S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 49(1). P. 205–210.
2. Cherry J. R., Fidantsef A. L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 14(4). P. 438–443.
3. Cizeikiene D., Juodeikiene G., Damasius J. 2018. Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus *Lactobacillus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Vol. 15. P. 185–191.
4. De Castro A. M., de Albuquerque de Carvalho M. L., Leite S. G. F., Pereira N. Jr. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 37(2). P. 151–158.
5. Duan C. J., Feng J. X. 2010. Mining metagenomes for novel cellulase genes. *Biotechnology Letters*. Vol. 32(12). P. 1765–1775.
6. Dutta T., Sahoo R., Sengupta R., Ray S. S., Bhattacharjee A., Ghosh S. 2008. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 35(4). P. 275–282.
7. Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F., Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*. Vol. 99(16). P. 7623–7629.
8. Gusakov A. V. 2011. Alternative to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*. Vol. 29(9). P. 419–425.
9. Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 13(2–3). P. 81–84.
10. Peiling C., Liming X. 2001. Production of cellulase by solid-state fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol. 65. P. 69–92.
11. Phitsuwan P., Laohakunjit N., Kerdchoechuen O., Kyu K. L., Ratanakhanokchai K. 2007. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiologica*. Vol. 58. P. 163–176.
12. Saini R., Saini J. K., Adsul M., Patel A. K., Mathur A., Tuli D., Singhania R. R. 2015. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for

- bioethanol application. *Bioresource Technology*. Vol. 188. P. 240–246.
13. Singh nee Nigam P., Pandey A. 2009. *Biotechnology for Agroindustrial Residues Utilisation: Solid-state Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues*. Netherlands: Springer.
 14. Singhania R. R., Sukumaran R. K., Pillai A., Prema P., Szakacs G., Pandey A. 2006. Solid-state fermentation of lignocellulosic substrate for cellulases production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 5. P. 332–336.
 15. Varnaitė R., Paškevičius A., Raudonienė V. 2011. Cellulose degradation in rye straw by micromycetes and their complexes. *Ekologija*. Vol. 54(1). 29–31.
 16. Varnaitė R., Raudonienė V., Bridžiuvienė D. 2011. Enzymatic Biodegradation of Lignin-Cellulose Complex in Plant Origin Material. *Materials Science (Medžiagotyra)*. Vol. 17(1). 99–103.
 17. Vintila T., Dragomirescu M., Jurcoane S., Vintila D., Caprita R., Maniu M. 2009. Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol. 14(2). P. 4275–4281.
 18. Watanabe H., Tokuda G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*. Vol. 55. P. 609–632.

Ieva Sendžikaitė, Dalia Čižeikienė, Vita Raudonienė, Algimantas Paškevičius

THE ACTIVITY STUDY OF FUNGAL CELLULASES ISOLATED FROM THE NATURAL ENVIRONMENT

Summary

In recent years the conversion of lignocellulosic biomass into higher value components gained a special interest. Enzymes cellulase are important because of their ability to decompose cellulose which is a part of lignocellulosic biomass. Using these enzymes it is possible to produce bioproducts and bio-fuels. It is relevant to investigate cellulase produced by fungi which are found in air or soil. In the present work, we investigated microorganisms – fungi – which were isolated from various sources. 29 different fungi from the Laboratory of Biodeterioration Research, Nature Research Centre, Vilnius, were tested using Congo Red dye. It was found that 11 isolates showed cellulolytic activity. Two of them were found to have the highest cellulolytic activity.

The influence of enzymatic hydrolysis conditions on cellulase activity obtained from newly isolated fungi belonging to *Penicillium* genus was studied. The highest cellulase activity was obtained at pH 7 and the optimum temperature was 50°C. The research was done at the Laboratory of Biodeterioration Research, Nature Research Centre, and the Department of Food Science and Technology, Faculty of Chemical Technology, Kaunas University, in 2017–2018.

Keywords: *Penicillium*, fungi, cellulase activity, wheat bran