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

დისერტაცია წარდგენილია ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიტატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
გიორგი კვესიტაძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი
ლალი ქუთათელაძე

თბილისი
2006

ს ა რ ჩ ე ვ ი

შესავალი.

თავი I.

ლიტერატურის მიმოხილვა.

1.1 ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები.

1.2 მიკროორგანიზმების კარბოჰიდრაზები.

1.3 საკვები არეების ოპტომიზაციისა და კულტივირების პირობების გავლენა კარბოჰიდრაზების ბიოსინთეზზე.

ექსპერიმენტული ნაწილი.

თავი II.

კვლევის მასალები და მეთოდები.

2.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა.

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

2.3 α- და გლუკო-ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით).

2.4 α-ამილაზური აქტივობის განსაზღვრა.

2.5 გლუკოამილაზური აქტივობის განსაღვრა.

2.6 საერთო ცელულაზური აქტივობის განსაზღვრა ფილტრის ქაღალდის მიხედვით.

2.7 კულტურების პათოგენურობის დადგენა

2.8 ტოქსიკურობის განსაზღვრა კურდღელზე კანის სინჯის მიხედვით

2.9 ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა.

2.10 კარბოჰიდრაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება.

2.11 ფერმენტული პრეპარატების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმების დადგენა.

თავი III.

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.

3.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა.

3.2 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება.

3.3 α- და გლუკო-ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით).

3.4 ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა .

3.5 კარბოჰიდრაზების (ამილაზების და ცელულაზების) აქტიური პროდუცენტი ექსტრემოფილური, მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ფიტო და ზოოპათოგენურობის დადგენა.

თავი IV

საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი ექსრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებიდან, კარბოჰიდრაზების – ამილაზების და ცელულაზების აქტიური პროდუცენტებისათვის საკვები არეების ოპტიმიზაცია და კულტივირების პირობების შერჩევა

4.1 ფერმენტების პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური საკვები არის შერჩევა და კულტივირების ოპტიმალური ხანგრძლივობის დადგენა სიღრმული კულტივირებისას

4.2 ფერმენტების პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას.

4.2.1 α-ამილაზას პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას.

4.2.2 გლუკოამილაზას პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას.

4.2.3 ცელულაზას პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას.

თავიV.

საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებიდან, გამოყოფილი ამილაზების და

ცელულაზების ფერმენტული პრეპარატების დახასიათება.

5.1 კარბოჰიდრაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება.

5.2 კარბოჰიდრაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმების დადგენა.

5.3 კარბოჰიდრაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების pH ოპტიმუმების დადგენა.

დასკვნები.

გამოყენებული ლიტერატურის სია.

შესვალი

დღეისათვის მიკრობიოლოგიური სინთეზი ბიოტექნოლოგიის ერთ-ერთ ყველაზე სწრაფად და ინტენსიურად მზარდ მიმართულებას წარმოადგენს. იგი 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.

ფერმენტების წარმომქმნელ მიკროორგანიზმთა დიდი უმრავლესობა - რომელ ტაქსონომიურ ჯგუფსაც არ უნდა ეკუთვნოდნენ - არიან მეზოფილები ანუ ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმები. 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 მათ მიერ წარმოებული სტაბილური ფერმენტების გამოყოფა, რადგანაც ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების მიერ

პროდუცირებული ფერმენტები უფრო სტაბილურები არიან, ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებულ ფერმენტებთან შედარებით და სტაბილურობას ინარჩუნებენ ექსტრემელურ პირობებშიც. ცნობილია, რომ მიკროორგანიზმებს შეუძლიათ ექსტრემალურ პირობებში არსებობა, რაც განპირობებულია, კრიტიკულ პრობებში მათი გენეტიკური აპარატისა და ნივთიერებათა ცვლის პროცესის შეცვლის უნარით.

მიკროორგანიზმები, როგორც ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებათა პროდუცენტები, გამოიყენებიან წარმოებაში უდანაკარგო ტექნოლოგიების შექმნის მიზნით და მნიშვნელოვანია ეკოლოგიური თვალსაზრისითაც. დიდ ინტერესს იწვევენ სწრაფი გამრავლებისა და არსეზონურობის გამო. ისინი ყველაზე ეფექტური ბიოლოგიური კატალიზატორებია, არატოქსიკურებია და აქვთ მათთვის სასურველი ნედლეულის, აგრეთვე ნარჩენებისა და ეკოლოგიური გამჭუჭყიანებლების ასიმილაციის უნარი.

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 პრაქტიკულად ყველა ტიპის ექსტრემალურ პირობას მოიცავს. მნიშვნელოვანია ის გარემოებაც, რომ კავკასიის რეგიონში გავრცელებული მიკროფლორა თითქმის არაა შესწავლილი.

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

ნაშრომის მიზანი და ამოცანები

<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.

თავი I

ლიტერატურის მიმოხლილვა

1.1 ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები

თანამედროვე ბიოლოგიის ერთერთი მნიშვნელოვანი პრობლემაა ცოცხალი ორგანიზმების არსებობის ზღვრების დადგენა. სახეობათა მრავალფეროვნებისა და რაოდენობის მიხედვით მიკრობული სამყარო მნიშვნელოვნად აჭარბებს დედამიწაზე არსებული სიცოცხლის ფორმებს. ორგანულ სამყაროში მიკროორგანიზმები წარმოადგენენ ორგანიზმებს, რომელთაც უნარი შესწევთ იარსებონ ექსტრემალურ პირობებში (მაღალი ტემპერატურა, მჟავე და ტუტე პირობები, მარილების მაღალი კონცენტრაციები). ამის საშუალებას მიკროორგანიზმებს აძლევს განსაზღვრული გენეტიკური და ფიზიოლოგიური ადაპტაციის უნარი. (66, 110, 117, 203, 219, 243, 267). ასეთ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმები იწოდებიან ექსტრემოფილებად. ექსტრემოფილები ძირითადად აერთიანებენ შემდეგ ჯგუფებს: თერმოფილები, ფსიქროფილები, ალკალი- და აციდოფილები და ჰალოფილები.

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

თერმოფილიის მოვლენა მრავალი მკვლევარის ყურადღებას იქცევს იმ მიზეზით, რომ შესწავლილი იქნეს მიკროორგანიზმების მექანიზმი, რომელთა საშუალებით მიკროორგანიზმები ეგუებიან არასასურველ ტემპერატურულ პირობებს, და მოძიებული იქნეს ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების პერსპექტიული პროდუცენტები, რომელთაც გააჩნიათ ზრდის მაღალი სიჩქარე.

პროკარიოტების და ეუკარიოტებისათვის ტემპერატურული ზღვრული დიაპაზონები განსხვავებულია. ეუკარიოტული ორგანიზმებისათვის ზრდის ზედა ტემპერატურული ზღვარი 62-65^{0}C შეადგენს (66, 110, 203, 219, 243, 244, 267), ფოტოტროფული ეუკარიოტებისათვის 57^{0}C-ს, ხოლო ბაქტერიებისათვის 75-100^{0}C-ს და უფრო მაღალ ტემპერატურასაც (114, 131, 189, 190, 220, 242,).

მიკრობულ სამყაროში განსაკუთრებული ექსტრემოფილობით გამოირჩევა ,,Archeaea”-ს (არქებაქტერიების) ჯგუფი, რომლებიც ჭეშმარიტი ბაქტერიებისა და

ეუკარიიოტებისაგან განსხვავებით, ჰიპერთერმულ მიკროორგანიზმებს წარმოადგენენ. არქიბაქტერიების ზრდის ქვედა ტემპერატურული ზღვარია 60^{0}C, ოპტიმალური ტემპერატურაა - 80^{0}C, მაქსიმალური ტემპერატურა კი არის 90^{0}C. (63, 114, 131, 189, 190, 242, 243).

მართალია, ეუკარიოტულ ორგანიზმებს პროკარიოტებისაგან განსხვავებით უჭირთ 70^{0}C-ზე მაღალ ტემპერატურაზე არსებობა, მაგრამ არანაკლებ ადაპტირებულნი არიან ექსტრემალური გარემოს (მაღალი ტემპერატურა) მიმართ (220).

კუნისა და ემერსონის მიხედვით თერმოფილად ითვლება მიკროსკოპული სოკოების ის კულტურები, რომელთა ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა 50^{0}C-ზე და მინიმალური 20^{0}C-ზე დაბლა არ არის. თერმოტოლერანტული არის ის კულტურა, რომელთა ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა 50^{0}C-თან არის ახლო, ხოლო მინიმალური 20^{0}C-ზე მნიშვნელოვნად დაბლაა (110).

სხვა ავტორთა განმარტებით, <u>თერმოფილური</u> (ობლიგატური თერმოფილი) სოკოებისათვის ზრდის მინიმალური ტემპერატურა 20^{0}C-ია, მაქსიმალური კი 50^{0}C-საც კი შეიძლება აღემატებოდეს, <u>თერმოტოლერანტული</u> (ფაკულტატური თერმოფილი) სოკოებისთვის (110, 191). ქვედა ზღვარი შეიძლება 20^{0}C-ის ქვევით იყოს, ხოლო მაქსიმალური კი 55^{0}C-ს აღწევდეს… (69, 191, 216).

მრავალი წელია ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების გამოყოფა წარმოებს ისეთი უნიკალური ნიშებიდან, როგორიცაა მზით გამთბარი ნიადაგები, თერმული ვულკანური კრატერები, კომპოსტური ორმოები, ბუნებრივად გამთბარი ნახშირის ნარჩენები, მყინვართა ყინულები, ზღვის ეკოსისტემა, მარჯნის რიფები, ქვიშის ბორცვები, გააქტივებული შლამი, მწერები და სხვა ბუნებრივი წყაროები. კონკრეტულად კი ცხელი თერმული წყლებიდან (“hot springs”) - გამოყოფენ თერმოფილურ ორგანიზმებს, ცივი არქტიკული ზღვებიდან – ფსიქროფილებს, ტუტე ტბებიდან – ალკალიფილებს, ცხელი გოგირდოვანი წყლებიდან აციდოფილებს, ბიცობი ნიადაგებისა და მლაშე ტბებიდან – ჰალოფილებს (115, 174, 216, 219, 220, 242).

ერთი საუკუნის წინ, ლინდტის მიერ პურიდან გამოყოფილი იქნა პირველი თერმოფილური სოკო *Mucor pusillus* (187, 191). მოგვიანებით ციკლინსკაიამ აღწერა სოკო - *Termomyces lanuginosus,* რომელიც მიღებული იქნა კომპოსტის მცირე

ნაწილაკების დათესვით კარტოფილიან არეზე (114, 190, 191, 257). აღსანიშნავია, რომ ორივე ობის სოკო "აღმოჩენილი" იქნა შემთხვევით, პროდუქტის დაბინძურების დადგენისას, როგორც დამბინძურებელი.

ჯიმ დიკონის მიერ აღწერილია ჩატარებული ანალოგიური კვლევები (114, 190): ბაღის კომპოსტის მცირე ნაწილაკების დათესვისას, კარტოფილ-დექსტოზიან აგარიზებულ არეზე, 45^{0}C ტემპერატურაზე, გამოყოფილია მიკროსკოპული სოკო - *Rizomucor pusillus*-ი. კულტურა წარმოქმნიდა სპორანგიოსპორებს და იზრდებოდა 20-55^{0}C ტემპერატურულ დიაპაზონში, მცენარეულ სუბსტრატში არსებული მარტივი შაქრების და ამინომჟავების ათვისების ხარჯზე (63, 64, 114, 131, 187, 189, 190, 191, 196, 197, 242, 243, 257).

მიკროსკოპული სოკო - *Termomyces lanuginosus*-ც გამოყოფილია კარტოფილ-დექსტოზისა და ალაოს ღივების შემცველი აგარიზებული არეებიდან.კულტურა თერმოფილია და მისი ზრდის ტემპერატული საზღვრებია 30-დან 52-55^{0}C-მდე (64, 114, 189, 190, 196, 197, 242). ასევე ალაოს ღივების შემცველ აგარიზებული არედანაა გამოყოფილი სოკო - *Thermoascus aurantiacus*-ი, რომელიც შედგება 1მმ-მდე ზომის ბევრი სპორებისაგან (ასკოსპორებისაგან), წარმოქმნის მონარინჯისფრ-მოყავისფრო კოლონიას, იზრდება 25-45^{0}C ტემპერატურულ დიაპაზონში და ცნობილია, როგორც ცელულაზის პროდუცენტი (114, 188, 190, 191, 196, 197).

კომპოსტის ბინადარია თერმოტოლერანტი მიკროსკოპული სოკო-*Aspergillus fumigatus,* რომელიც აგარიზებულ პეტრის თასებზე ზდისას წარმოქმნის მორუხო-მომწვანო ფერის მარცვლოვან კოლონიებს და იზრდება 12-52^{0}C დიაპაზონში (63, 114, 190, 196, 197, 242).

სოფლის მეურნეობის შესანახი პროდუქტების თერმოგენეზის (სითბოს წარმოქმნის) პროცესის ასახსნელად, ჰიუგო მიეჩმა შეისწავლა ნოტიო თივის ზვინის თვითგათბობისა და თვითაალების უნარი. ავტორმა ექსპერიმენტულად დაასაბუთა, რომ საპროფიტული მეზოფილური სოკოების საარსებო გარემოში ტემპერატურის მატება ეგზოთერმული რეაქციების შედეგს წარმოადგენს. არის ტემპერატურა თავიდან 40^{0}C-ს აღწევს, რის შედეგადაც ხდება მეზოფილური მიკროფლორის დათრგუნვა, შემდეგ, კი ტემპერატურა 60^{0}C-მდეც აღწევს. ასეთი თივიდან მიეჩმა გამოყო შემდეგი თერმოფილური კულტურები: *Mukor pusillus, Termomyces*

lanuginosus, *Thermoidium sulfureum* და *Thermoascus aurantiacus* (114, 190, 191, 196, 197, 242).

ანალოგიურ დასკვნამდე მივიდა კურტ-ნოაკი. მან ზომიერი კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონიდან გამოყო თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოები (191, 207, 242).

კომპოსტური პროცესის მექანიზმების კვლევისას აღწერილია 50-ზე მეტი გამოყოფილი თერმოფილური სოკო (191, 219).

ტიპიური კომპოსტური პროცესის მექანიზმის არსი შემდეგში მდგომარეობს - მეზოფილური მიკრობული ზრდის შედეგად ხდება სითბოს გენერაცია, ტემპერატურის მომატების შედეგად ითრგუნება ბაქტერიები და განვითარებას იწყებენ თერმოფილური სოკოების სპორები. თვითგათბობადი მასალიდან (ჩიტის ბუდეები, მზით გამთბარი ნიდაგები) გამოყოფილი მიკრომიცეტების ზრდა მიმდინარეობს კომპოსტზე არის გათბობის პირობებში და მდგრადობას ინარჩუნებს მაღალ ტემპერატურულ ფაზაში (114, 190, 191, 196, 197, 242).

მრავალი მეცნიერის მიერ დემონსტრირებულია თერმოფილური სოკოების გავრცელება იმ ნიადაგებში, რომელიც თბება მზის სხივების საშუალებით (34, 82, 120, 245).

ნიადაგებში, სადაც იზრდებიან თერმოფილური სოკოები, მაღალი ტემპერატურა ნარჩუნდება მხოლოდ განსაზღვრული დროით. სასიცოცხლო ციკლის მნიშვნელოვანი ნაწილი თერმოფილური სოკოებისა მიმდინარეობს იმ სახეობებთან ერთად, რომელთაც მეზოფილური პირობების გამო მათ მიმართ აქვთ უპირატესობა. თუ თერმოფილური სოკოების სპორები ჩამოყალიბებულია და მომწიფებულია ტემპერატურაზე, რომელიც გაცილებით მაღალია ამ სოკოების მინიმალურ ტემპერატურაზე, მომავალში ეს კულტურები მინიმალური ტემპერატურის დასაშვები ზღვარის ქვემოთაც კი ინარჩუნებენ სიცოცხლისუნარიანობას და რჩებიან ასეთნი მრავალი წლის განმავლობაში მეზოფილური ტემპერატურის პირობებშიც (106, 247).

უკანასკნელ წლებში აქტიურად მიმდინარეობს თერმოფილური სოკოების გამოყოფა სასუქიანი ნიდაგის კომპოსტებიდან, სამთო კარიერებიდან, ქვანახშირის მაღაროებიდან, სანაპირო ქვიშიდან, ბირთვული რეაქტორების ნაჟურებიდან,

მკვდარი ზღვის მიმდებარე ველებიდან, საუდის არაბეთის უდაბნოს ნიადაგებიდან (91, 110, 203, 219, 249, 251, 267).

მრავალი სამეცნიერო კვლევა ეძღვნება თერმოფილების ძიებას ბუნებრივ თერმულ საბადოებში. ინდოეთში ორისას მიდამოებში, ,,ტაფტაანის" ლოკალური ცხელი გოგირდოვანი წყლებიდან გამოყოფილია მიკროორგანიზმების (ბაქტერიები, აქტინომიცეტები, სოკოები) 33 თერმოფილური კულტურა (216, 217, 218).

მრავალი წლის მანძილზე "ნაციონალური ყვითელმიწა პარკი"-ის გეოთერმული წყაროების მიმდებარე ნიადაგები ითვლებოდა უნაყოფო, სტერილური რეგიონად (91, 110, 203, 219, 249, 251, 267). ამ ნიადაგებში გოგირდწყალბადისა და სულფიდების ჟანგვის შედეგად წარმოიქმნება გოგირდმჟავა, რის გამოც pH-ის მნიშვნელობა 2.7-ს აღწევს, ტემპერატურა კი 70^{0}C-მდე იზრდება. აღნიშნული ეკოსისტემისათვის დამახასიათებელია მეჩხერი მცენარეული საფარი და ნახშირბადის შეზღუდული შემცველობა. უკიდურესად ექსტრემალური პირობების მიუხედავად, გეოთერმული წყაროების მიმდებარე ნიადაგების მიკრობიოლოგიური შესწავლით გამოყოფილია თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოები. აღსანიშნავია, რომ ბაზიდიალური სოკოების არცერთი კულტურა არ არის გამოვლენილა. (ლიტ. თითქმის არ არსებობს ცნობა ბაზიდიალური სოკოების ექტრემოფილობის შესახებ). გამოყოფილი 16 კულტურა, მიეკუთვნებოდა მიკროსკოპული სოკოების კლასებს : *Deuteromycetes, Ascomicetes* და *Zygomicetes*. გამოყოფილი სოკოებიდან 2 აღმოჩნდა თერმოფილური კულტურა - *Acremonium alabamenense* და *Dactyllaria constrictum* var. *gallopava*, რომელთათვისაც ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა იყო 55^0. 6 კულტურა - თერმოტოლერანტი (*Absidia cylindrospora, Aspergillus fumigatus, A. niger, Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2, *Penicillium* sp. 3), ეს კულტურები იზრდებიდნენ pH 3.0-6.0 დიაპაზონში. (85, 99, 117). გამოყოფილი 16 კულტურიდან მხოლოდ სამ კულტურას შესწევდა 0-დან 20^{0}C-მდე ტემპერატურაზე ზრდის უნარი. საინტერესო შედეგები იქნა მიღებული აღნიშნული პარკის გეოთერმული ნიადაგების მიკრობიოლოგიური კვლევის პროცესში, რომელიც 12 თვეს გრძელდებოდა, კერძოდ, *Penicillium* sp. 4 გამოყოფილი იქნა ისეთი ზონიდან, სადაც ტემპერატურა იცვლებოდა 20-40^{0}C-მდე, ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა კი იყო 20^{0}C-ზე დაბალი.

თერმოფილური კულტურები - *Acremonium alabamenense* და *Dactyllaria constrictum* გამოყოფილია, როგორც 20^0-ზე დაბალი, ასევე 40^0-ზე მაღალი ტემპერატურის მქონე ნიადაგებიდან, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ თერმოფილურობის მიუხედავად, ამ კულტურების სპორები სიცოცხლისუნარიანობას დაბალ ტემპერატურაზეც ინარჩუნებენ. საგულისხმოა, რომ "ნაციონალური ყვითელმიწა პარკი"-ის გეოთერმული ნიადაგებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები განსხვავდებიან მსგავსი სახეობის სხვა წარმომადგელებისგან, გარემოს ცვალებად პირობებთან ადაპტაციის მაღალი უნარით, რაც განაპირობებს მათ ტოლერანტობას pH-ის ფართო დიაპაზონში ტემპერატურის ცვალებადობაზე (85, 99, 117, 219).

ამავე ავტორების მიერ აღწერილია საინტერესო მოვლენა, კერძოდ, ლპობადი ხის კუნძიდან, რომელშიც ტემპერატურა იყო 107^0C, გამოყვეს მიკროსკოპული სოკო, რომელიც ლაბორატორიულ პირობებში ამ ტემპერატურაზე აღარ იზრდებოდა. ეს კულტურა არ არის იდენტიფიცირებული (219).

მსგავსი ინფორმაციები წარმოდგენილია ბროკისა და სხვა მკვლევარების პუბლიკაციებშიც: თერმოფილური სოკოების გავრცელების ეკოლოგიური პირობების შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ კომპოსტიური გარემოდან, სადაც ტემპერატურა 80^0C-ს აჭარბებდა, გამოყოფილი სოკოებისათვის ლაბორატორიულ პირობებში ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა 60^0C-ია (98, 220, 248).

ალბათ მხედველობაშია მისაღები ის ფაქტი, რომ ლაბორატორიულ პირობებში მიკროორგანიზმების მაქსიმალური ზრდის სიჩქარე არის უფრო მაღალ ტემპერატურაზე, ვიდრე ბუნებრივ პირობებში (სოკოების გამოყოფის ადგილი) (111).

ამავდროულად, თერმომედეგობა ცოცხალი ორგანიზმებისა მნიშვნელონად აჭარბებს ბიოკინეტიკური ზონის საზღვრებს. თუ თერმოფილების შემთხვევაში, მათი უნარი იარსებონ მაღალ ტემპერატურაზე განისაზღვრება გენომით, მეზოფილების თერმომედეგობა განპირობებულია მიკროორგანიზმების გენეტიკური ადაპტაციით გარემოს არახელსაყრელ პირობებთან. (ამ შემთხვევაში მაღალი ტემპერატურა). ამასთანავე მიკროორგანიზმების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა, და პირიქით სიცოცხლუუნარობა დაკავშირებულია ცალკეული უჯრედული კომპონენტების თერმოსტაბილურობასთან (25, 111).

ამდენად, თერმომედეგი ორგანიზმები არ არის აუცილებელი ეკუთვნოდნენ თერმოფილებს.

მიკროორგანიზმები, რომელთა ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა 15^{0}C-ზე დაბალია, მაქსიმალური – კი 20^{0}C-მდე აღწევს. ფსიქროფილურ მიკროორგანიზმებს წარმოადგენენ. ისინი ნამდვილი ექსტრემოფილები არიან, რადგან მდგრადობას იჩენენ არა მხოლოდ დაბალი ტემპერატურისადმი, არამედ არსებობენ როგორც ზღვების სიღრმეებში და ყინულებში, ასევე მლაშე გარემოში (მაგ.: მარინადში) და მაღალი რადიაციული დასხივების პირობებშიც, აგრეთვე თოვლში, კლდის ნაპრალებში და ა.შ. ამის მიხედვით იყოფიან: ბარო- ანუ პიეზო-ფსიქროფილებად, ჰალო-ფსიქროფილებად და ტროგლო-ფსიქროფილებად (გამოქვაბულების ბინადარნი).

ფსიქროფილურ მიკროორგანიზმებს შორის გვხვდებიან: ბაქტერიები, არქიბაქტერიები, საფუვრები, სოკოები, წაყალმცენარეები (ზოგიერთი სხვა მცენარეც), პროტოზოა და სხვა უხერხემლოები. მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოვლენილია *Penicillium*-ის და *Cladosporium*-ის გვარის წარმომადგენლები (132).

ქართველი მეცნიერების მიერ ყაზბეგის რაიონის ალპური ზონის ნიადაგებიდან გამოყოფილია მიროსკოპული სოკოების 57 კულტურა. ფსიქროფილებს ძირითადად ეკუთვნოდნენ *Fusarium*-ის გვარის წარმომადგენლები (2).

ფაკულტატურული ფსიქროფილები იზრდებიან დაბალ ტემპერატურაზე, მაგრამ მათი მაქსიმალური ტემპერატურა გაცილებით მაღალია, ვიდრე ობლიგატური ფსიქროფილების. მათ ასევე უწოდებენ სიცივემედეგს ან ფსიქროტოლერანტს (20).

ხშირად ფსიქროფილები და მეზოფილები ხასიათდებიან ერთნაირი ტემპერატურული რეჟიმით სავარაუდოდ მიკროორგანიზმების ამ ჯგუფებს შორის განსხვავება საძიებელია მათ ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიურ თვისებებში (147).

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

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

ძირითადად მიკროორგანიზმების ზრდა-განვითარება ხდება ნეიტრალურ და ნეიტრალურთან ახლო pH-ის მნიშვნელობაზე, თუმცა არსებობს მიკროორგანიზმები რომლებიც იზრდებიან ნეიტრალურიდან საკმაოდ დაშორებულ pH-ზე (118, 134).

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

მრავალი მკვლევარის მოსაზრებით აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH ხშირად არ შეესაბამება გარემოს მჟავიანობას. ყველაზე აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH-იც კი ხნდახან ოდნავ უახლოვდება დაბალ pH-ს. (pH-5,0), მაშინ როდესაც მათი ზრდის pH ოპტიმუმი არის pH-2.0 (34, 88, 98, 245).

შეხედულება უჯრედშიდა pH-ზე, როგორც თეორიულად აუხსნელ პრობლემაზე, საუკეთესოდ წარმოაჩინა სისომ და პონტენმა (238), კერძოდ:

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

პროკარიოტულ სამყაროში აციდოფილების მრავალი წარმომადგენელია თერმოფილი, რადგან ისინი თერმული - გოგირდოვანი წყლების ბინადრებს წარმოადგენენ. *Sulfolobus* გვარის არქიბაქტერიები, იზრდებიან 1.0-5.8 pH-ის დიაპაზონში და მათი ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა 70^{0}C. ცნობილია ამავე გვარის აციდოფილური არქეები, რომელთა ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმია 80^{0}C (63, 99, 114, 190, 220). შლეპერმა მიკროორგანიზმების ამ ტაქსონომიური ჯგუფს შემატა ორი ახალი სახეობა - *Picrophilus oshimae* და *P. torridus.* (220, 230).

ლიტ. წყაროებიდან ცნობილია რომ, მჟავე pH-ის მიმართ ყველაზე მდგრადი ორგანიზმებია მიკროსკოპული სოკოები (27, 34, 240, 245, 260).

ჯერ კიდევ 1943 წელს ვაკსმანის მიერ გამოკვლეული იქნა, რომ მიკროსკოპული სოკოები *Acontium velatium* და *Cephalosporium* იზრდებიან 2.5 N გოგირდმჟავაში (27, 240).

აღწერილია ზოგიერთ ობის სოკოს და ბაქტერიას: *Candidum caldarium, Acontium cylatium, Cephalosporium spp.*, და *Trichosporon cerebriae* უნარი გაიზარდონ უკიდურესად მჟავა pH-ზე, კერძოდ pH 1.0-ზე. ეს არის pH – ის ზღვარი, სადაც ჩვეულებრივ მიკროორგანიზმები წყვეტენ ზრდა-განვითარებას (27, 72, 88, 129, 230).

თერმოაციდოფილებს წარმოადგენენ "ნაციონალური ყვითელმიწა პარკის"-ის გეოთერმული ნიადაგებიდან გამოყოფილი *Aspergillus*-ის, *Abzidia*-სა და *Penicillium*-ის გვარის სახეობები (219).

სპილენძის საბადოებიდან გამოყოფილია, აციდოფილური სოკოების 26 სახეობა, რომლებიც მიეკუთვნებოდნენ *Aspergillus*-ის, *Penicillium*-ის და *Rhizopus*-ის გვარს. დღეს ამ კულტურებს წარმატებით იყენებენ მინერალებიდან სპილენძის მოპოვების პროცესში (215).

ალკალიფილური მიკროორგანიზმების უმრავლესობა ბაქტერიებია, თუმცა მიკროსკოპულ სოკოებშიც გვხვდება ექსტრემოფილები ამ ნიშნით. სხვადასხვა გვარის მიკროსკოპული სოკოები განსხვავებულად რეაგირებენ მაღალ და დაბალ pH-ზე. თუმცა უნდა აღინიშნოს რომ, უმეტესი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები ბაქტერიებისაგან განსხვავებით იზრდებიან pH-ის ფართო დიაპაზონში – 2.0-დან 11.0-მდე, განსაკუთრებით კი *Aspergillusus*-ის, *Penicillium*-ის და *Fusarium*-ის გვარის წარმომადგენლები (27, 72, 159, 261, 263).

აფრიკის ტბებიდან: ,,მანიერა", ,,სუმი" და ,,ნაკურუ", და ჩინეთში არსებული ტბიდან ,,The Baer Soda Lake" გამოვლენილია როგორც ალკალიფილური და ასევე ჰალოფილური მიკროორგანიზმები (პროკარიოტები და ეუკარიოტები). ეს ტბები ხასიათდება ნატრიუმის ბიკარბონატის ($NaHCO_3$) მაღალი შემცველობით, და შესაბამისად ტუტე და მლაშე პირობებით (115, 220).

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

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

ტაილანდელი მეცნიერების კვლევის შედეგებმა აჩვენეს, რომ ექსტრემალური კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმებს შორის სჭარბობს ექსტრემოფილური კულტურები. (174).

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

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

ზოგიერთ მიკროორგანიზმს, მათ შორის სოკოებსაც შესწევთ უნარი ისეთ მძაფრ გარემო პირობებში არსებობისა, სადაც წყლის აქტივობა დაბალია (მარილების მაღალი კონცენტრაცია, გვალვა ან გაყინული წყალი). მათი ადაპტაციის უნარი განპირობებულია ამ ორგანიზმების ოსმოფილური ბუნებით. ისინი სტრესულ გარემო პირობებში (მარილების მაღალი კონცენტრაცია, ექსტრემალური ტემპერატურა, გაყინვა-გადნობა და გამოშრობა) უჯრედის მემბრანის გასწვრივ ინარჩუნებენ ოსმოსურ წონასწორობას, შეთავსებადი ხსნარების - ოსმოლიტების (მაგ. გლიცეროლი) აკუმულაციის ხარჯზე (136, 175, 183, 213, 221, 276).

არსებობს ოსმოფილების ორ ჯგუფი: 1. ქსეროფილები -იზრდებიან ოგანული საქაროზას, ან გლიცეროლის შემცველ არეებზე და მარილების მაღალ კოცენტრაციას ეგუებიან უჯრედში სხვადასხვა ორგანული მჟავების (ოსმოლიტების) აკუმულაციის ხარჯზე; 2. ჰალოფილები იზრდებიან გარემოში, სადაც დომინირებს Na-ის და Mg-ის იონები (115, 175, 221).

განსაკუთრებული ექსტრემალური ჰალოფილურობით არქიბაქტერიები გამოირჩევიან, აღმოჩენილია მათი ახალი სახეობები *Halogeometricum* (200),

Haloterrigena, *Haloferax.* თუმცა სხვადსხვა მიზეზთა გამო მათი შემდეგი კვლევა არ ხერხდება. *Haloarcula* (79, 161, 199).

სხვადასხვა მკვლევარის მიერ დახასიათებული და შესწავლილია სხვადასხვა ტიპის მლაშობები, საიდანაც გამოყოფილია მიკროსკოპული სოკოები, ასეთი მზიანი მლაშობებია: ესპანეთში ,,სანტაპოლა" და ისრაელში ,,ეილატი" (144). ეგვიპტესა და ტუნისში კი მლაშე ტბები, სადაც არის მარილის მაღალი შემცველობა და ტემპერატურა (115).

1977 წელს, კრონინმა და პოსტმა, პირველებმა დაიწყეს მლაშე გარემოს შესწავლა. იუტაში, "დიდი მლაშე ტბის" სანაპირო ზოლიდან გამოყვეს სოკო, რომელიც იზრდებოდა ტბაში ჩაძირული ფიჭვის ნაფოტებზე და მიეკუთვნებიდა *Cladosporium*-ის გვარს (112).

მოგვიანებით 1998 წელს, ბუჩალომ თანამშრომლებთან ერთად მკვდარი ზღვის მიდამოებიდან, რომელიც მდიდარია Mg-ის მარილებით, გამოყო და შეისწავლა ჰალოფილური მიცელიალური სოკო *Gymnascella marimortui* რომელიც განეკუთვნა ასკომიცეტების რიგს (101), მისი ზრდის ოპტიმალურ პირობას წარმოდგენდა წყალში არსებული მარილების მაღალი კონცენტრაცია, 10-30%-ის შემცველობით, და წარმოადგენდა ობლიგატურ ჰალოფილს. სხვა მეცნიერების მიერ (171, 172, 173) მკვდარი ზღვიდან (მლაშობია და მდიდარია Mg-ის იონებით) გამოყოფილი და შესწავლილი იქნა შემდეგი კულტურები: *Aspergillus versicolor, Chaetomium globosum, Eurotium herbariorum, E. amstelodami.*

რუის-სუარესმა მაიაგუეზის ყურის სანაპიროს ქვიშების მიკრობიოლოგიის შესწავლისას დაადგინა რომ, ზღვის სანაპიროზე დომინირებს *Aspergillus*-ის გვარის წარმომადგენლები (224). შემდეგ წელს კი ნიევეს-რივერასთან ერთად გამოყო ჰალოფილური მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა გვარები: *Aspergillus, Cladosporium, Dreschlera, Fusarium, Geotricum, Penicillium, Trichoderma, Mucor* და *Rhizopus*. აღმოჩნდა, რომ შექმნილ კოლექციაშიც დომინირებდა *Aspergillus*-ის გვარის სახეობები. ეს ავტორები ასაბუთებენ, რომ სანაპირო ზოლში სოკოების სახეობრივი შემადგენლობა და რაოდენობა პირდაპირ კავშირშია ზღვის წყალში არსებული მარილის კონცენტრაციასთან (206).

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

გამოყოფა ხდებოდა ალაოს ღივებისა და კარტოფილის დექსტროზის შემცველ საკვებ არეებზე 15% NaCl-ის თანაობისას. იდენტიფიცირებულია 8 სხვადასხვა გვარის 17 სახეობის სოკო : *Alternaria* sp. *Aspergillus elegans, A. sydowii, A. terreus, A. versicolor, A oryzae, A. japonicus, A. niger aggregate, Cladosporium cladosporioides, C. sphaerospermum, Eurotium amstelodami, Penicillium chrysogenum, P. expansum, Stemphylium* sp. და სხვა. გამოყოფილი სოკოების დიდი ნაწილი ტოლერანტულობას ავლენდა, არის NaCl-ის 30%-იანი კონცენტრაციის პირობებში, ტემპერატურისა და pH-ის ფართო დიაპაზონში, შესწავლილი იქნა მათი მეორადი მეტაბოლიტების წარმოების უნარი ყველაზე დიდი სიხშირით გამოვლინდა *Aspergillus*-ის გვარის სახეობები, თუმცა გამოვლენილი იყო ასკომიცეტების კლასის სხვა გვარების სახეობები და ასევე ბაზიდიომიცეტების კლასის წამომადგენლები (115).

ჰალოფილური სოკოები აღმოჩენილი და გამოვლენილია პოლარული (არქტიკული) ყინულებშიც. აღმოჩნდა რომ მსგავსი სახეობების არსებობა შესაძლებელი იყო როგორც მლაშე წყლებში, ასევე არქტიკის სანაპირო ზოლში (6). გამოვლენილ დომინანტურ სახეობებს შორის იყვნენ ჰალოფილური შავი საფუარი: *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmatostroma salinum*, ჰალოტოლერანტობას ავლენდნენ *Aureobasidium pullulans* (144) და *Cladosporium*-ის გვარის სხვადასხვა სახეობები (156, 241) და *Eurotium*-ის გვარის წარმომადგენლის *teleomorphic xerophilic* ექვსი ნაირსახეობა (102), ასევე ბაზიდიომიცეტების *Wallemia*-ს გვარის სამი წარმომადგენელი. ამ პირობებში *Aspergillus*-ის და *Penicillium*-ის შეხვედრის სიხშირე იყო ნაკლები (143, 175, 221, 274).

პოლარული (არქტიკული) მდანარი ყინულებიდან გამოყოფილი ოსმოფილური სოკოების შესწავლისას ვარაუდობდნენ, რომ ისინი მძაფრ ექსტრემალურ გარემოს უზრუნველყოფენ საკვები კომპონენტებით (175).

ჰალოტოლერანტული სოკოების გავრცელების კიდევ ერთ არეალს წარმოადგენს მარილიანი ჭაობები. აბდელ-ჰაფეზის აზრით, ასეთ ჭაობებში, სოკოები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ მცენარეული ნედლეულის გახრწნაში (58). ევროპის

ამ ტიპის მლაშობებში ნაპოვნია მიკროსკოპული სოკოების სპორები, რომელთაA 80% იდენტიციებული იყო, როგორც სახეობა *Glomus geosporum*-ის წარმომქმნელი (153). მარილოვანი ჭაობების მიკორიზული მცენარეებიდან გამოყოფილია *Glomus*-ის გვარის სხვა სახეობებიც (185).

პორტუგალიის ჭაობების შესწავლისას კორვალჰომ თანამშრომლებთან ერთად დაასაბუთა რომ ჭაობის მცენარეების ტოლერანტობას მარილის მაღალი კონცენტრაციების მიმართ უზრუნველყოფს *Glomus*-ის გვარის მიკორიზული სოკოების არსებობა და ადაპტაცია მარილის მაღალი კონცენტრაციის მიმართ (104).

კანადაში კარბონატული ნიადაგებიდან (,,სოდოვანი მხარიდან") გამოყოფილი იქნა მიკროსკოპული სოკოები (ასკომიცეტების გვარიდან). NaCl-ის მაღალი კონცენტრაციით გამოწვეული სტრესის მექანიზმის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ ზოგიერთი სახეობა - სტრესული ფაქტორის საპასუხოდ - უჯრედში ინტენსიურად აგროვებს დისაქარიდ ტრეგალოზას (95). ერთ-ერთი კულტურა *Aspergillus nidulans*-ი NaCl-ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად იწყებს სხვა ,,ოსმოლიტების" გლიცეროლისა და ერითროტოლის სინთეზს.

სლოვენიაში შექმნილია ,,MZKI"-ის კოლექცია, რომელიც მოიცავს მიცელიალური სოკოების 300 სახეობას, და ძირითადად შედგება Hyphomycetes-ის, Zygomycetes-ის, Ascomycetes-ის და Basidiomycetes-ის კლასის წარმომადგენლებისაგან. ნინა გუნდე-ციმერმანის მიერ შესწავლილი და დახასიათებულია ამ კოლექციის ჰალოფილური და ჰალოტოლერანტული სოკოები, რომლებიც არიან კარბოჰიდრაზების (ცელულაზების, პექტინაზების, პროტეაზების და ლიპაზების), ორგანული მჟავებისა და მეტაბოლიზმის სხვა პროდუქტების მწარმოებლები (,,MZKI") (143, 275).

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

ექსტრემოფილური მიცელიალური სოკოების სელექციის თვალსაზრისით ძალიან დიდ ინტერესს იწვევს კავკასიის რეგიონი, რომელიც განსხვავებული

ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონებისაგან შედგება, და პრაქტიკულად ყველა ტიპის ექსტრემალურ პირობებს მოიცავს. ამიტომ, უკანასკნელი 5 წლის განმავლობაში ს. დურმიშიძის სახ. ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში აქტიურად მიმდინარეობს სხვადასხვა ნიადაგობრივ-კლიმატური ზონებიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმების კოლექციის შექმნა. სავარაუდოდ ამ კოლექციაში წარმოდგენილი იქნება მიკროორგანიზმების თერმო- და ფსიქროფილური, ალკალი- და აციდოფილური, და ჰალოფილური კულტურები.

ექსტრემალურ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმებიდან გამოყოფილ ფერმენტებს კი უნარი შესწევთ სხვადახვა კრიტიკულ პირობებში მოხვედრისას იყვნენ აქტიურები და სტაბილურები. ამრიგად, ექსტრემოფილები წარმოადგენენ ექსტრემო-ფერმენტების ანუ კრიტიკული პირობებისადმი მდგრადი ფერმენტების პროდუცენტებს (174).

1.2 მიკროორგანიზმების კარბოჰიდრაზები

ფერმენტების აღმოჩენამ მნიშვნელოვანი გარდატეხა შეიტანა სიცოცხლის განვითარების შესწავლაში დედამიწაზე.

სწორედ ფერმენტები წარმოადგენენ ყველა ცოცხალი ორგანიზმის ძირითად სამოქმედო ინსტრუმენტებს, ახორციელებენ ცოცხალ ორგანიზმში მიმდინარე თითქმის ყველა ქიმიურ რეაქციას და უზრუნველყოფენ ენერგიით.

მართალია პირველი ფერმენტი ჯერ კიდევ 1814 წელს იქნა აღმოჩენილი კირჰოფის მიერ, მაგრამ თავად ფერმენტების მოქმედების მექანიზმი მხოლოდ მე-20 საუკუნის 40-50-იან წლებში იქნა ახსნილი. გამოვლენილი იქნა ფერმენტების გამოყოფის წყაროები და აღმოჩნდა რომ ფერმენტებს პრაქტიკულად ყველა ცოცხალი არსება ასინთეზებს, კერძოდ ცხოველების ქსოვილები, მცენარეებისა და მიკროორგანიზმების უჯრედები. და მაინც, ყველაზე პერსპექტიულ წყაროდ ითვლებიან მიკროორგანიზმები (1, 5, 100, 174). მათ გააჩნიათ მთელი რიგი უპირატესობანი – სელექციის მეთოდების გამოყენებით, თვისებების ფართო ვარირება, კულტივირების პირობებით ბიოსინთეზის გაძლიერება, სხვადასხვა

სუბსტრატებზე სიღრმული ურთიერთქმედება, ფერმენტული კომპლექსების ფართო სპექტრი და გენური ინჟინერიაში გამოყენება მათი გენების კლონირებით. განსაკუთრებით კი ამ უნარით გამოირჩევიან მიცელიალური სოკოები.

უკანასკნელი 15 წლის განმავლობაში განსაკუთრებით გაიზარდა ინტერესი ექსტრემალურ პირობებში მოქმედი ფერმენტებისა და მათი წარმომქმნელი მიცელიალური სოკოების მიმართ. ეს კი გამოწვეულია მათი გამოყენების დიდი პოტენციალით ფერმენტულ მრეწველობაში.

ფერმენტულ მრეწველობაში კი სადღეისოდ შემდეგი ვითარებაა - მთელი ფერმენტული პრეპარატების 80%-ზე მეტი გამოიყენება მრეწველობის შემდეგ სამ დარგში – გლუკოზა-ფრუქტოზას მაღალი კონცენტრაციების მქონე სიროფების მიღება, ამას ხმარდება წარმოებული ფერმენტების 40%-ზე მეტი (ამილაზები, ქსილოზო-იზომერაზა); დეტერგენტების წარმოება (30%-ლიპაზები, პროტეაზები, ამილაზები, ცელულაზები); ყველის წარმოება (10%-ზე მეტი, პროტეაზები).

როგორც პრაქტიკამ აჩვენა, ყველა ამ დარგებში, მაღალ ტემპერატურულ რეჟიმში ან სხვა ექსტრემალურ პირობებში (მაღალი და დაბალი მჟავიანობა) მოქმედი ფერმენტების გამოყენება დიდ უპირატესობებთან არის დაკავშირებული.

მიკროსკოპული სოკოების მიერ პროდუცირებულ ფერმენტებს შორის მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს კარბოჰიდროლაზებს (ამილაზები, ცელულაზები).

ამილაზები ბუნებაში ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებული ფერმენტების ჯგუფს წარმოადგენენ. არსებობენ ენდო- და ეგზო-ამილაზები, რომლებიც მოქმედებენ როგორც კომპლექსურად, ასევე დამოუკიდებლად. მათ შორის პრაქტიკული თვალსაზრისით დიდ ინტერესს იწვევს გლუკოამილაზა, α-ამილაზა და β-ამილაზა. (3, 7, 10, 27, 96, 188).

<u>α-ამილაზა:</u> α-ამილაზა (კ.ფ 3.2.1.1. a-ამილაზა ან α-1,4-გლუკან-გლუკანოჰიდროლაზა) ახდენს α-1,4 გლუკანური ტიპის ბმების ჰიდროლიზს პოლისაქარიდებში, რომლებიც შეიცავენ სამზე მეტ – გლუკოზის ნაშთს და დაკავშირებული არიან α-1,4 ტიპის გლუკანური ბმებით. α-ამილაზა მოქმედებს სახამებელზე, გლიკოგენზე და მათ მსგავს პოლი- და ოლიგოსაქარიდებზე, რის შედეგადაც წარმოიქმნება მალტოზის, გლუკოზის და მალტოტრიოზის ნარევი (1, 7, 28, 64, 65, 87, 103, 133, 146, 162, 191, 228).

ყველა ცნობილ α-ამილაზას მოქმედების მექანიზმი თითქმის ერთი და იგივე აქვს. ეს ფერმენტები აწარმოებენ სახამებლის მოუწესრიგებელ ჰიდროლიზს. ხლეჩენ მხოლოდ α-1,4 ტიპის გლუკანურ ბმას სახამებლის მოლეკულაში – გლუკოზის პირველ ნახშირბადის ატომსა და ჟანგბადს შორის, რომლითაც ეს ნახშირბად – ატომი დაკავშირებულია მეზობლად მდებარე გლუკოზის მოლეკულასთან. ცნობილია აგრეთვე ისიც, რომ რაც უფრო მცირდება ამილოზის მოლეკულა, α-ამილაზა ჰიდროლიზს უფრო ნაკლები სიჩქარით აწარმოებს, ე.ი. α-ამილაზას ფერმენტული რეაქციის სიჩქარე დამოკიდებულია სუბსტრატის პოლიმერიზაციის ხარისხზე (1, 7, 27).

სახამებლის ჰიდროლიზის პროცესი რამდენიმე სტადიად მიმდინარეობს. პირველ სტადიაში α-ამილაზას მოქმედების შედეგად ჰიდროლიზატში გროვდება დექსტრინები, მეორე სტადიაში წარმოიქმნება ტეტრა- და ტრიმალტოზა, რომელთა ჰიდროლიზი α-ამილაზით დი- და მონოსაქარიდებამდე მიმდინარეობს ნელა.

α-ამილაზას მოქმედების სქემა შეიძლება შემდეგნაირად გამოისახოს:

სახამებელი

α-ამილაზა დექსტრანები + მალტოზა + გლუკოზა

გლიკოგენი

ნახაზი 1

<u>**გლუკოამილაზა:**</u> გლუკოამილაზა (ფ.კ. 3.2.1.3. ანუ 1,4-α-D-გლუკან გლუკოჰიდროლაზა, γ-ამილაზა, α-გლუკოზიდაზა, მალტაზა) ეკზოგენური ტიპის ფერმენტია, რომელიც პოლისაქარიდს არარედუცირებული ბოლოდან თანდათანობით აშორებს D-გლუკოზის ნაშთს. მოქმედებს სახამებელზე, გლიკოგენზე, და მათ მსგავს პოლი- და ოლიგოსაქარიდებზე. გლუკოამილაზა ახდენს α-1,4 და α-1,6-გლუკანური ტიპის ბმების გახლეჩას და აწარმოებს მალტოზას ჰიდროლიზს. მალტოზა წარმოადგენს საუკეთესო ინდუქტორს გლუკოამილაზის სინთეზისათვის სახამებელს გარდაქმნის 90-98% გლუკოზად (27, 133, 191) ზოგიერთ შემთხვევაში ხლეჩს α-1,2 ბმას – საქაროზაში (46) და სახამებელზე მოქმედების შედეგად იძლევა მხოლოდ - D-გლუკოზას.

სახამებელი, რომელიც ამილაზების მოქმედებისათვის სუბსტრატს წარმოადგენს, მცენარეული პოლიმერია, წარმოდგენს კომლექსურ ნაერთს და ორი პოლისაქარიდული კომპონენტისაგან – ამილოზისა (20-30%) და ამილოპექტინოსაგან (70-80%) შედგება (სახამებლისა და გლიკოგენის არასრული ჰიდროლიზის პროდუქტების წარმოადგენენ) (1, 7, 10).

ამილოზა სწორხაზოვანი პოლიმერია, შედგება გლუკოზის ნაშთებისაგან, რომლებიც დაკავშირებულია α-1,4-გლიკოზიდური ბმებით. ამილოპექტინის პოლიმერული ჯაჭვი განშტოებულია და განშტოების ადგილებში გლუკოზის ნაშთები ერთმანეთს უკავშირდებიან α-1,6-გლიკოზიდური ბმებით, ჯაჭვის სწორხაზოვან უბნებზე კი - α-1,4-გლიკოზიდური ბმებით (1, 7).

სახამებლის მაღალი შემცველობით ხასიათდება ყველა სახის მარცვლეული, კარტოფილი, სორგო, კასავა. ამ კატეგორიის სუბსტრატების ამილაზური ფერმენტეული ჰიდროლიზით მიღებული პროდუქტებიდან სპირტული დუღილით იწარმოება: ხორბლიდან - რუსული არაყი; ხორბლიდან, ქერიდან, სიმინდიდან – შოტლანდიური ვისკი; ბრინჯიდან – იაპონური საკე; კარტოფილიდან, ხორბლიდან - გერმანული შნაპსი (1, 174).

გლუკოამილაზას აქტივობის განსაზღვრისათვის ძირითადად გამოიყენება მეთოდები, რომლებიც დამყარებულია აღმდგენელი შაქრების საერთო რაოდენობის განსაზღვრაზე (264) და D-გლუკანმჟავაში, გლუკოზის სპეციპიკურ დაჟანგვაზე გლუკოზოოქსიდაზით (32, 54, 225).

ცნობილია, გრაჩოვისა და მისი თანაავტორების მეთოდი (16) სადაც სახამებლის ჰიდროლიზატებში გლუკოზის განსაზღვრა ხდებოდა ზიხარტ-ბლეიერის მოდიფიცირებული მეთოდით. აგრეთვე აღსანიშნავია დალქვისტის მეთოდი, რომელიც დამყარებულია გლუკოზოოქსიდაზურ-პეროქსიდაზურ ანალიზზე (123).

გლუკოამილაზას აქტივობის განსაზღვრისათვის პაზური და სხვები იყენებდნენ გლუკოზოოქსიდაზურ-პეროქსიდაზურ მეთოდს, სადაც სუბსტრატს წარმოადგენდა ამილოზა, ხოლო ქრომოგენს – 0-დიანოზიდინი (209). საბინი და სხვები კი სუბსტრატად იყენებდნენ მალტოტეტროზას, ხოლო ქრომოგენად 3-დიმეთილამინობენზოლ მჟავას და 3-მეტალ-2(3H) ბენზოტიაზოლინს (227).

რუხლიადევასა და მისი თანაავტორების მიერ შემუშავებულია გლუკოამილაზას განსაზღვრის პოლირიმეტრული მეთოდი, α-ამილაზას გამოყენებით. სადაც სუბსტრატად იყენებენ მალტოზას, ხოლო საბოლოო პროდუქტს წარმოადგენს გლუკოზა.

გლუკოამილაზას აქტივობის პოლარიმეტრული მეთოდით გაზომვის დროს, სუბსტრატზე ისაზღვრება პოლარიზაციის სიბრტყის მობრუნების კუთხის ცვლილება გლუკოამილაზას მოქმედებამდე და მოქმედების შემდეგ. ეს ცვლილება ფერმენტის რაოდენობისა და მისი მოქმედების დროის პროპორციულია (47).

α-ამილაზას აქტივობის განსაზღვრისათვის გამიყენებულია რუხლიადევასა და გორიაჩევას (47); ცეშკას (123); რუტლოფის (225); ჰიროიუკის (154); გუილბოულტის (142) .

ყველაზე ფართო გამოყენებას პოულობენ, მიკროორგანიზმებიდან - კერძოდ ობის სოკოებიდან და ბაქტერიებიდან - გამოყოფილი α-და გლუკო ამილაზას ფორმები (28).

მიკროსკოპულ (ობის) სოკოებში ამილაზების ველაზე აქტიური პროდუცენტები არიან ძირითადად *Aspergillus*-ის და *Risopus*-ის გვარის წარმომადგენლები: *A. niger, A. awamori, A. batate, A. phoenicis, A. usamii, A. orizae*, *Aspergillus nidulans, A. foetidium*, *Aspergillus hermebergi (A. niger* group) (16, 138, 182, 216, 218), *Rh. delemar, Rh. fon Kinensis, Rh. javenicus, Rh. japonicum* (41, 256, 265).

პირველად გლუკოამილაზა აღმოჩენილ იქნა *Rhizopus*-ისა და *Aspergillus*-ის კულტურალურ სითხეში, კორმანისა და ლანგლიკის მიერ 1948 წელს (12).

ლიტერატურულ მონაცემებზე დაყრდნობით *Aspergillus*-ის გვარის გლუკოამილაზა აწარმოებს როგორც α-1,4, ისე α-1,6-გლუკოზიდური ბმების ჰიდროლიზს. აგრეთვე აღსანიშნავია, რომ იგი უფრო სწრაფად ახდენს დექსტრანის პოლიმერების α-1,4 ბმების ჰიდროლიზს, ვიდრე α-1,6 გლუკანური ბმებისას (139, 166).

მიკროსკოპული სოკოების გარდა გლუკოამილაზას აქტიური პროდუცენტები აღმოჩენილია *Endomykopsis, Endomyces, Saccharo-myces, Candida*-ს გვარის საფუვრებში (149, 193).

სახამებლიდან გლუკოზის მისაღებად იაპონიაში, რუსეთში, სლოვაკეთსა და გერმანიაში იყენებდნენ *Endomykopsis*-ის გვარის საფუვრიდან გამოყოფილ გლუკოამილაზას (14, 16, 149).

გლუკოამილაზას პროდუცენტებს მიეკუთვნება ზოგიერთი *Clostridium*-ის და *Flavobacterium*-ის გვარის ბაქტერიების სახეობები (193).

ბაქტერიებიდან გამოყოფილი α-ამილაზების პროდუცენტებიდან აღსანიშნავია: *Bacillus subtilis, B. coagulans, B.stearothermophilus, B. polymyxa, B. macerans, B. amyloliguefaciens, B. licheniformis* (28), *B. diastaticum, B.mesentericum* (17), *Pseudomonas Saccharophile, Entamoeba histolitica* (28).

თუმცა მხოლოდ ობის სოკოების მიერ პროდუცირებულ α-ამილაზებს შეუძლიათ სახამებლის 80% გარდაქმნან მალტოზად, მაშინ როდესაც ბაქტერიული ამილაზები სახამებლის დაშლით წარმოქმნიან ძირითადად დექსტრინებს (7, 10, 27, 191).

ამიტომ განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს *Aspergillus*-ის α-ამილაზები, რადგან მრეწველობაში ძირითადად ეს ფერმენტები გამოიყენება. პიგმენტის წარმოქმნის უნარის მიხედვით ისინი იყოფიან მომწვანო-მოყვითალო და შავ ასპერგილებად. იმის მიხედვით თუ რომელ ჯგუფს მიეკუთვნება ესა თუ ის ასპერგილი, განსხვავებულია მათ მიერ სინთეზირებული α-ამილაზაც.

მომწვანო-მოყვითალო ასპერგილების α-ამილაზას PpH ოპტიმუმია 4.7-4.8; pH 3.0-ის პირობებში კი განიცდის დენატურაციას (10, 19, 27).

ამილაზური ფერმენტები ზოგ შემთხვევაში, სუბსტრატზე მოქმედებენ კომლექსურად მათი ერთობლივი მოქმედების შედეგად შეიძლება დაჩქარდეს ან შენელდეს სახამებლის ჰიდროლიზის პროცესი. აბე ჯუნ ჩი-ს, ნაკაჟიმასა და სხვა მკვლევართა მიერ შესწავლილია შტამი *Aspergillus* sp. K-27, სადაც შეინიშნება α- და გლუკო-ამილაზების სინერგისტული მოქმედება - როდესაც რეაქცია მიმდინარეობს ფერმენტული კომლექსის მოქმედებით და წინა ფერმენტის რეაქციის პროდუქტი, შემდეგი ფერმენტული რეაქციისათვის წარმოადგენს სუბსტრატს, ფერმენტების ამგვარ მოქმედებას სინერგიზმი ეწოდება: (60, 191). ამ კულტურის მიერ წარმოებული გლუკოამილაზა თერმო-სტაბილურობით ხასიათდებოდა და მძიმე მეტალებით არ

ინჰიბირდებოდა. მისი ხვედრითი აქტივობა იყო 90,2 ერთეული/მგ, გამოსავლიანობა კი 60% (59).

მრავალი მკვლევარის მიერ იქნა შესწავლილი თერმოფილური შტამი *Thermomyces lanuginosus,* რომელიც შემცველ არეში აწარმოებდა, როგორც α-ამილაზის ასევე გლუკოამილაზის სინთეზს, თუმცა ამ ფერმენტების მოქმედება არ გამოსახავდა სინერგიზმს. შესწავლილი იყო *Thermomyces lanuginosus* IISc91-ის α-ამილაზა, რომელიც 65^{0}C-ზე 4სთ ინარჩუნებდა სტაბილურობას Ca-ის იონების თანაობისას. მალტოზა ყველაზე დიდი რაოდენობით მიიღებოდა მაშინ, როდესაც სუბსტრატად გამოყენებული იყო გადაუმუშავებელი უმი კარტოფილი (191, 198).

Thermomyces lanuginosus IISc91-ის გლუკოამილაზა 60^{0}C-ზე 7სთ-ის განმავლობაში ინარჩუნებდა მდგრადობას (Ca^{2+} იონების თანაობისას სტაბილურობა მცირდება) და ახდენდა უმი კარტოფილის სახამებლის 76%-ის კონვერსიას გლუკოზად 24სთ-ის განმავლობაში, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ საბოლოო პროდუქტით არ ხდება ფერმენტის მოქმედების ინჰიბირება. ეს ფერმენტი იძლევა საშუალებას გამოყენებული იქნას გლუკოზის სიროფების კომერციულ წარმოებაში (198).

ნიადაგიდან გამოყოფილი სოკო - *Aspergillus tamairi*-ც ავლენდა ორივე - გლუკოამილაზურ და α-ამილაზურ აქტივობას, მინერალურ საკვებ არეში სახამებლის ან მალტოზის არსებობისას, როცა pH იყო 4.0-10.0, ხოლო ტემპერატურა - 25-45^{0}C (202).

ბრაზილიაში, ტანიოკას პლანტაციის ნიადაგიდან გამოყოფილი იქნა საფუვრის სახეობის - *Saccharomyces cereviscae* 1200 შტამი, რომლებიც იზრდებოდნენ სახამებლიან არეზე და აღენიშნებოდათ ამილაზების წარმოქმნის უნარი (184).

ტაილანდელი მეცნიერების კვლევის შედეგებმა აჩვენეს, რომ სტაბილური ფერმენტების ძიება ძირითად წარმოებს ექსტრემალურ პირობებში მცხოვრები მიკროორგანიზმებს შორის. მათ აჩვენეს, რომ ნიადაგიდან (pH 9.0) გამოყოფილ 500 კულტურას შორის 23 კულტურა წარმოქმნიდა α-ამილაზს, რომლის მოქმედების pH ოპტიმუმი იყო 9.0 (174).

შესწავლილი იყო მიკროსკოპული სოკოების *Aspergillus*-გვარის ალკალიფილური კულტურები, მათგან გამოყოფილი ფერმენტები ხასიათდებოდნენ

მკვეთრად გამოხატული რეაქციის ტუტე ოპტიმუმით. მაგ.: ტუტე პროტეაზა – pH 11.5-12.0. პექტინაზა – pH 10.0-10.5.(19,20) . ტუტე ამილაზა – pH 10.0 (157, 158).

ასევე ეჭვს არ იწვევს, რომ თერმოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები უფრო მდგრადები არიან და მათი მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი უახლოვდება მიკროორგანიზმების ზრდის ტემპერატურულ ოპტიმუმს (191).

ასე მაგ.: ორისას მიდამოებში, ,,ტაფტაანის" ლოკალური ცხელი გოგირდოვანი წყლებიდან, გამოყოფილ თერმოფილურ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის გამოვლენილი *Aspergillus*-ის სახეობებს შორის, ამილაზური ფერმენტების პროდუცენტი აღმოჩნდა 26 თერმოფილური სოკოს კულტურა, რომელთაც მიერ პროდუცირებული ამილაზები სტაბილურნი იყვნენ და ინარჩუნებდნენ საწყის აქტივობას 80^0C-ზე 30 წუთის განმავლობაში. ამილაზური ფერმენტების პროდუცენტები წარმოადგენდნენ *Aspergillus oryzae. A. niger, Saccharomyces castelli*-ის სახეობებს (216, 217, 218).

ლიტერატურაში შედარებით მწირია ინფორმაცია კარბოჰიდრაზების პროდუცენტ ჰალოფილური და ჰალოტოლერანტული სოკოების შესახებ. კულტურა - *Penicillium fellutanum*-ი რომლის გამოყოფაც მოხდა, ,,mangrove rhizosphere"-ს ნიადაგებიდან, აღმოჩნდა α-ამილაზის პროდუცენტი (148, 164, 208). კულტურა მაღალ ფერმენტულ აქტივობას ავლენდა როდესაც საკვებ არეში ზღვის წყლის შემცველობა 60% შეადგენდა, მაგრამ ფერმენტული აქტივობა გაცილებით მაღალი იყო გამოხდილი წყალის არსებობისას, რაც ამ კულტურის ჰალოტოლერანტულ ბუნებაზე მეტყველებს (164).

ამდენად, მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტების აქტივობა დამოკიდებულია კულტურის თვისებებზე, და მაქსიმალური აქტივობის მიღწევის მიზნით საჭიროა მათი კულტივირების პირობების ოპტიმიზაცია (7, 10, 27, 208).

<u>**ცლულაზები:**</u> ცელულაზები წარმოადგენენ ფერმენტულ კომპლექსს, რომლებიც ახდენენ ცელულოზის ჰიდროლიზს და განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან მოქმედების მექანიზმით.

ფერმენტული სისტემა, რომელსაც “ცელულაზურ კომპლექს” უწოდებენ საერთაშორისო ნომენკლატურის მიხედვით იყოფა 4 ჯგუფად:

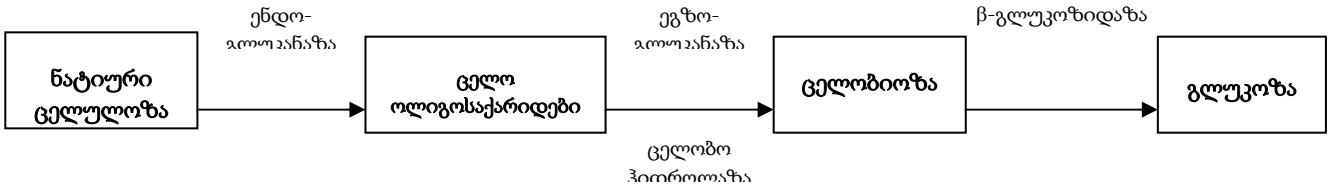
1. ენდო-გლუკანაზა [EG] ანუ ენდო-1.4-β-D-გლუკანაზა (3.2.1.4) - ენდოცელულაზა (ცელულაზა, კარბოქსილმეთილცელულაზა, ენდო-1.4-β-D-გლუკან-4-გლუკანოჰიდროლაზა, C_X). მოქმედებს ამორფულ უბნებზე, მოუწესრიგებელი მექანიზმით ახორციელებს შიდამოლეკულური β-1.4 ბმების ჰიდროლიზსს ნაკლები პოლიმერიზაციის ხარისხის მქონე პოლისაქარიდებად და წყალში ხსნად ცელო-ოლიგოსაქარიდებამდე. (ამ ფერმენტების აქტივობა განისაზღვრება მათი უნარით წარმოქმნან აღმდგენელი შაქრები კმც-დან (1, 10, 260).

2. ეგზო-1,4-β-გლუკანაზა [CBH], (3.2.1.91) - ეგზოცელულაზა, (1.4-β-D-4 გლუკან-ცელობიოჰიდროლაზა, ეგზოცელობიოჰიდროლაზა, ავიცელაზა, C_1). ახდენენ დისაქარიდ ცელობიოზის მოხლეჩას სუბსტრატის კრისტალური უბნებიდან. ახასიათებთ სრულიად უუნარობა კმც-ს ხსნარების სიბლანტის შემცირებისა

3. ეგზო-1,4-β-გლუკოზიდაზა (3.2.1.74) – ეგზოგლუკოჰიდროლაზა (ეგზოგლუკოზიდაზა, 1.4-β-D-გლუკან-გლუკოჰიდროლაზა) ახლეჩს გლუკოზას კმც-ს არააღმდგენელი ბოლოდან - β-1,4-გლუკანების ჯაჭვში.

4. β-გლუკოზიდაზა (3.2.1.21) – ცელობიაზა, (1.4-β-D-გლუკოზიდ გლუკოჰიდროლაზა, ეგზოგლუკოჰიდროლაზა) ჰიდროლიზის გზით ახლეჩს გლუკოზას წყალში ხსნადი ოლიგოსაქარიდების, დისაქარიდებისა და β-D-გლუკოზიდაზების არააღმდგენელი ბოლოდან, აგრეთვე ცელობიოზას შლის გლუკოზამდე. მართალია იგი უშუალოდ არ მოქმედებს ცელულოზაზე, მაგრამ აუცილებელია ცელულოზის სრული ჰიდროლიზისთვის გლუკოზამდე (1, 10, 93, 191, 260).

ცელულოზის ბიოკონვერსია გლუკოზად, მიმდინარეობს სქემის მიხედვით, რომელიც წარმოდგენილია შემდეგ ნახაზზე.



ცელულოზა მცენარეული მასალის ძირითადი კომპონენტია, ცელულოზაშემცველი მცენარეული ნედლეული კი ნახშირბადის განახლებად წყაროს წარმოადგენს, რომელიც შეიძლება გამოყენებული იქნეს როგორც ნედლეული მრავალი ნივთიერების წარმოსაქმნელად. ცელულოზა ბიოპოლიმერია რომლის პოლომერიზაციის ხარისხი 1000-ზე მეტია და შედგება D გლუკოზის ნაშთებისაგან, რომელიც ერთმანეთთან დაკავშირებულია β-1.4 გლიკოზიდური ბმებით (1, 252, 260). ნატიური ცელულოზა ბოჭკოვანი სტრუქტურის მქონე ნაერთია, რომელსაც აქვს როგორც კრისტალური ასევე ამორფული უბნები (80, 260).

ჰიდროლიზის საბოლოო პროდუქტის მიღება დამოკიდებულია, როგორც ფერმენტული კომლექსის, ასევე სუბსტრატის თვისებეზე (194, 260).

პრაქტიკულად ცელულოზის ჰიდროლიზი, ხსნადი შაქრების წარმოქმნით, ხორციელდება ქიმიური და ფერმენტული გზით. ფერმენტული გარდაქმნა ხორციელდება მიკროორგანიზმების (ბაქტერიების, სოკოების, აქტინომიცეტების) შტამებით, რომელთაც ცელულაზების სინთეზის უნარი შესწევთ (1, 260).

ცელულაზური კომპლექსის ცალკეული აქტივობების განსასაზღვრავად იყენებენ სხვადასხვა სუბსტრატებს: Na კმც-ს მარილის ჩანაცვლების ხარისხით 0,5-0,75, ვატმანის ტიპის ფილტრის ქაღალდს, ბამბას, მიკროკრისტალურ ცელულოზას, ცელობიოზასა და ნიტროფენილ β-გლუკოზიდს (53).

ცელულოზა უხსნადი სუბსტარტია, რომლის ჰიდროლიზიც მიმდინარეობს "ცელულაზური კომპლექსის" საშუალებით, რომელიც ძირითადად შეიცავს სამი ტიპის ფერმენტებს: ენდოგლუკანაზებს, ეგზოგლუკანაზებს და ცელობიაზებს, ისინი განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან, როგორც მოქმედების მექანიზმით ისე ჰიდროლოზის საბოლოო პროდუქტით (1, 191, 260). ცელულოზის გარდაქმნის პროცესი საკმაოდ რთულია. ამ პროცესში შუალედური პროდუქტების სახით წარმოიქმნება მაღალ- და დაბალმოლეკულური ოლიგოსაქარიდები, რომლებიც საბოლოო ფერმენტული ჰიდროლიზის შედეგად გარდაიქმნებიან გლუკოზად. რეაქციის ამ ჯაჭვში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს სინერგიზმი ცელულაზური კომლექსის ცალკეულ კომპონენტებს შორის. თითოეული ფერმენტი ამზადებს

სუბსტრატს შემდგომი მოქმედებისათვის. ფერმენტის მოქმედების შედეგად იხსნება შესაძლო მაინჰიბირებელი ეფექტი. ისეთი ორგანიზმები, რომლებიც ცელულაზური კომლექსის ყველა კომპონენტს ასინთეზებს იშვიათია, მიუხედავად ამისა, ასეთი პრეპარატები საბოლოოდ მაინც წარმოქმნიან გლუკოზას (1, 53).

ცელულაზები - მრავალფერმენტული სისტემაა, რომელიც ინტერესს იწვევს ინდუსტრიული გამოყენების პოტენციალით (260, 262).

სოკოური წარმოშობის ცელულაზები მნიშვნელოვანია იმით რომ, შესწევთ უნარი ცელულაზების სრული კომლექსის წარმოქმნისა და ფერმენტის დიდი რაოდენობით პროდუცირებისა (260). ცელულაზების პროდუცენტ სოკოებს, ბაქტერიებთან შედარებით, მეტად შესწევთ უნარი წარმოქმნან ფერმენტები მჟავე გარემოში (124).

თერმო-აციდოფილური შტამი *Thermoascus aurantiacus*-ი მაღალ ცელულაზურ აქტივობას ავლენს pH 2.9-4.5-ზე 65-760C ტემპერატურაზე (76, 191, 204, 260).

ცნობილია და შესწავლილია ცელულაზების პროდუცენტი აქტიური შტამები: *Trichoderma reesei* (76, 93, 177, 178, 201, 205, 260), *Penicillium pinophilum* (92, 93, 181, 205, 260), *Penicillium funiculosum* (180, 270), *Fusarium oxysporum* (107, 108, 179, 260). *Sporotrichum pulverulentum* (*Phanerochaete chrysosporium*) (93, 126, 128, 216, 205, 260), *Taleromyces emersonii* (76, 195, 216, 217, 205, 260), *Fusarium solani, Trichoderma koningii*, *Rhizopus oryzae* (76, 93, 205, 260). *Melanocarpus albomyces* (77, 260). ანაერობი სოკოებიდან ცნობილია *Neocallimastix*, *Cacomyces, Oprinomyces* (271, 272, 260), რომლებიც აქტიურ პროდუცენტებს წარმოადგენენ.

ცნობილია ასევე თერმოფილური შტამები, რომლებიც მაღალი აქტიურობით ხასიათდებიან: *Sporotrichum thermophile* (*Myceliophthora thermophila*) (76, 205, 223, 260), *Thermoascus auranticus* (76, 169, 191, 204, 260), *Humicola griseus* (76, 150, 191, 204, 260), ასევე *Humicola* sp. (151, 233, 260), *Talaromyces emersonii*, *Trichoderma viride*, *Humicola insolens*, *Chaetomium thermophile* (76, 125, 191, 204) *T. Lignorium, T. Longibrachiatum*, *Asergillus tereus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *Allecheria terrestris* (76, 191, 204, 216, 217) და სხვები.

როიმ და სხვებმა შეისწავლეს თერმოსტაბილური ცელულაზის პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკო *Myceliopthora thermophila* (*Sporotrichum thermophile*) (223, 231, 260), რომელიც საინტერსოა იმით, რომ ფერმენტი სტაბილურობას ინარჩუნებს pH-ის

ფართო დიაპაზონში (მაღალ მჟავე და ტუტე გარემოში) 90^{0}C ტემპერატურაზე. ეს ფერმენტი საინტერესოა კომერციული თვალსაზრისით, გამოიყენება საფეიქრო მრეწველობაში, დეტერგენტებისა და ქაღალდის წარმოებაში.

სტაბილური ფერმენტები მიღებული იქნა შემდეგი შტამებიდან: *Humikola* sp. (151, 233, 165, 260).

თერმოფილური შტამი *Humicola insolens*-ი აპროდუცირებს შვიდ განსხვავებულ ცელულაზურ კომპონენტს, ეს ფერმენტები აქტიურები არიან pH-ის ნეიტრალურ და ტუტე დიაპაზონში 7.0-10.0. ამ ფერმენტების გამოყენება ხდება როგორც ბოიკონვერსიაში, ასევე დეტერგენტების, ქაღალდის წარმოებასა და საფეიქრო მრეწველობაში (232, 260).

ორისას მიდამოებში, ,,ტაფტაანის" ლოკალური ცხელი გოგირდოვანი წყლებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოებიდან, გამოვლენილი *Aspergillus*-ის 7 სახეობა მაღალ ცელულაზურ აქტივობას ავლენდა 60^{0}C-ზე (174).

კომპოსტიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკო - *Aspergillus fumigatus* იზრდება 12-52^{0}C დიაპაზონში. წარმოადგენს ცელულაზის პროდუცენტს, და საკვებად საავიაციო ნავთის გამოყენებისას შლის სხვადასხვა ნახშირწყლებს (63, 114).

ცელულაზის აქტიური პროდუცენტი შტამი - *Trichoderma reesei*, ხასიათდება ცელულაზური სისტემის წარმოქმნის საუკეთესო უნართ, აწარმოებს სამი სხვადასხვა სახის ენდოგლუკანაზას, ორ – ცელობიოჰიდროლაზის, და β გლუკოზიდაზის სინთეზს, რომელთა სინერგისტული მოქმედების შედეგად ხორციელდება კრისტალური ცელულოზის გლუკოზად გარდაქმნა (76, 177, 178, 201, 236, 260).

ცნობილია ჰიპერცელულაზური შტამი *Trichoderma* sp., რომელიც ხასიათდება მჟავე ცელულაზით და მისი გამოსავლიანობის გაზრდა მნიშვნელოვანია ინდუსტრიული გამოყენებისათვის (177, 260). დეტერგენტების წარმოებაში, როგორც დამარბილებელი (ამცირებენ ბამბის ქსოვილის სიხისტეს) დანამატები, გამოიყენებიან ტუტე სტაბილური ცელულაზები, აგრეთვე ამილაზები, პროტეაზები, ლიპაზები (84, 160, 260), ამ მიზნით ზოგიერთი (ბაზარზე არსებული) ბაქტერიალური ცელულაზის გამოყენებაც ხდება, მაგრამ მათი გამოსავლიანობა დაბალია და დანახარჯი იზრდება. კომერციული თვალსაზრისით სოკოური წარმოშობის ცელულაზების გამოყენება უფრო მნიშვნელოვანია, რადგან დეტერგენტების pH 7.0-

10.5-ის ტოლია, ამიტომ ფერმენტი ტუტე გარემოსადმი უნდა ამჟღავნებდეს მდგრადობას.

მკვლევარმა სანტოს რ. ვაისმა ტუტე გარემოდან გამოყო მიკრომიცეტები და სკრინინგის გზით გამოავლინა ტუტესტაბილური ცელულაზის პროდუცენტი აქტიური შტამი *Fusarium* sp. (260), რომელისთვისაც ოპტიმალური pH 8.0-10.0-ის ტოლია, და 60^{0}C-ზე აქტიურობას ინარჩუნებს pH-ის ფართო დიაპაზონში (4.0-10.0).

ცნობილია ტუტე სტაბილური ცელულაზების პროდუცენტი შტამები: *Humikola* sp, *Myceliopthora* sp, და *Cephalosporium* sp. (165, 260), რომლებიც აქტიურები არიან ტუტე გარემოში. ფერმეტული მოქმედების შესწავლისას აღმოჩნდა რომ უპირატესობა ენიჭებოდა ენდოგლუკანაზას, რადგანაც იგი კრისტალურ უბნებზე არ მოქმედებს და არ აზიანებს ბამბის ქსოვილის ბოჭკოებს.

ტუტე სტაბილური ცელულაზები (ამცირებენ ქსოვილის სიხისტეს) წარმატებით გამოიყენება ცელულოზა-ქაღალდისა და დეტერგენტების წარმოებასა, და საფეიქრო მრეწვწლობაში (83, 105, 141, 145, 170, 260, 263).

მიკრობული გზით წარმოქმნილი ფერმენტების უნარი მოახდინონ ცელულოზის ბიოდეგრადაცია ინტერესს იწვევეს როგორც მეცნიერული, ასევე მიკრობული ეკოლოგიისა და ინდუსტრიული მიკრობიოლოგიის თვალსაზრისითაც, მოკროორგანიზმების მიერ წარმოებული ცელულაზები ახდენენ ცელულოზის გლუკოზამდე ბიოკონვერსიას. ცელულაზების საშუალებით შესაძლებელია მიკრობული ცილის, ძვირფასი მონოსაქარიდების, თხევადი საწვავის და აგრეთვე ცილით მდიდარი ბიომასის მიღება განახლებადი ნედლეულისაგან და ლიგნინო-ცელულაზური მასალისაგან (260, 266).

გლუკოზა – მიიღება ცელულოზის მჟავური ან მიკრობული ჰიდროლიზის შედეგად; ცილა მიიღება მიკროორგანიზმების პირდაპირი კულტივირებით ცელულოზის შემცველ სუბსტრატებზე; თხევადი საწვავი – ეთილის სპირტი მიიღება ცელულოზის ჰიდროლიზის პროდუქტების დუღილით; ანაერობული ფერმენტაციით მიიღება ორგანული გამხსნელები და შესაბამისი პროდუცენტების კულტივირებით ცელულოზის გარდაქმნის შედეგად მიიღება ქიმიკატები და ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები. ეს პროცესები პერსპექტივაში შესაძლებელია გამოყენებული იქნას სოფლის მეურნეობის და მრეწველობისა ცელულოზაშემცველი ნარჩენების

რაციონალური უტილიზაციისათვის, რაც ასევე საშუალებას იძლევა დავიცვათ გარემო დაბინძურებისაგან. ცელულაზური ფერმენტების მეშვეობით ხდება დაბინძურებული წყლების გაწმენდა და მუნიციპალური ნაგვის გადამუშავება. ცხოველების საკვებად უხეში ხის და მერქნოვანი მასალა ცელულაზების საშუალებით გარდაიქმნება ადვილად მოსანელებელ საკვებად (121, 163, 216, 260, 262).

სახამებლის ფერმენტული ჰიდროლიზისათვის რაციონალური გამოყენება ჰპოვეს α-ამილაზასა და გლუკოამილაზას სოკოვანი წარმოშობის ფერმენტულმა პრეპარატებმა. ამ ფერმენტების საშუალებით შესაძლებელია სახამებელშემცველი სუბსტრატების ჰიდროლიზის განხორციელება და დაბალმოლეკულური მადუღარი შაქრების მიღება. გამოიყენებიან სპირტისა და ლუდის წარმოებაში, პური-ფუნთუშეულისა და საკონდიტრო წარმოებაში. აგრეთვე მედიცინაში (ენზიმოთერაპიაში, ღვიძლისა და სხვა ორგანოების გლიკოგენეზური დაავადების სამკურნალოდ).

ამიტომ, თანამედროვე ბიოტექნოლოგიურ მრეწველობაში ერთ-ერთ ყველაზე მძლავრ და მნიშვნელოვან მიმართულებას წარმოადგენს ფერმენტული პრეპარატების მიღება. ფერმენტები ის აგენტებია, რომლებიც ცოცხალ ორგანიზმებში ქიმიური გარდაქმნების დიდ უმრავლესობას აკატალიზებენ და ბიოტექნოლოგიური პროცესების საფუძველს წარმოადგენენ.

კომერციული ფერტმენტების 90%-ზე მეტი, წარმოების სიმარტივის, მაღალი აქტიურობისა და ფართო გენეტიკური სპექტრის გამო, მიკროორგანიზმებიდან მიიღება. მიკრობული წარმოშობის ფერმენტები ინტენსიურად გამოიყენება კვების, მსუბუქ, ქიმიურ მრეწველობასა და სამედიცინო პრაქტიკაში. ამიტომ მიკრობული წარმოშობის ფერმენტების მიღებას და პრაქტიკულ გამოყენებას მრეწველობაში განსაკუთრებით დიდი მნიშვნელობა ენიჭება.

ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატი წარმოადგენს სხვადასხვა ცილების ნარევს, რომელშიც ძირითადია ის, რომლის სახელსაც ატარებს პრეპარატი. ამ ფერმენტული ცილის რაოდენობა ცილის საერთო რაოდენობის 20% მაინც უნდა იყოს.

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

რაოდენობები. ნახშირბადისა და აზოტის წყარო, მისი ფასი და კვებითი თვისებები, რაც ქიმიური შემადგენლობით განისაზღვრება.

დღეისათვის ფერმენტული პრეპარატების ფართო გავრცელების ერთ-ერთ ძირითად ფაქტორს წარმოადგენს ის, რომ ისინი კარგად იხსნებიან წყალში და მშრალი პრეპარატების სახით მიღებისას არ კარგავენ მათთვის დამახასიათებელ აქტივობას (4, 5).

1.3 საკვები არეების ოპტომიზაციისა და კულტივირების პირობების გავლენა კარბოჰიდრაზების ბიოსინთეზზე

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

მიკროორანიზმების სიცოცხლისუნარიანობასა და მათ უნარზე წარმოქმნან განსაზღვრული ფერმენტები დიდი ინტესივობით, დიდად არის დამოკიდებული საკვები არის სწორად შერჩევა. კერძოდ, ნახშირბადის, აზოტისა და ფოსფორის წყაროები. მაგრამ განსაკუთრებული როლი მიკროორგანიზმების ბიოსინთზის უნარში, მაინც მიეკუთვნება ნახშირბადის წყაროს. სწორედ ნახშირბადის წყაროს ინდუქციისა და რეპრესიის გზით ხდება ფერმენტების სინთეზის რეგულაცია (21, 22, 89, 119).

გარემო არის ფაქტორები ასევე უმნიშვნელოვანეს გავლენას ახდენენ მიკროორგანიზმების ნივთიერებათა ცვლის ხასიათზე (1). აქედან გამომდინარე, კულტივირების პირობების (წნევა, ტემპერატურა, საკულტივაციო არის მჟავიანობა, აერაცია) შერჩევა არის ერთ-ერთი გზა, რათა რეგულირებული იქნას ორგანიზმის ბიოსინთეზური აქტივობა, გენეტიკურ აპარატზე ზემოქმედების გარეშე.

სინთეზის რეაქციის ძირითად კომპონენტებს წარმოადგენენ დაბალმოლეკულური მეტაბოლიტები. თუმცა არეში, სადაც მიმდინარეობს კულტივირება, მინერალურ კომპონენტებისა და დაბალმოლეკულური ორგანული ნაერთების გვერდით, ყოველთვისაა მაღალმოლეკულური ნაერთებიც, რომლებიც ჰიდროლიზს განიცდიან მიკროორგანიზმების ჰიდროლიზული ფერმენტებით. გარკვეული ფერმენტებისათვის ბიოსინთეზის უნარის ამაღლებას, უზრუნველყოფს საკვები არის ისეთი კომპონენტები როგორიცაა ნახშირბადი, აზოტი და ფოსფორი (8).

მიკროორგანიზმები სხვადასხვა ნახშირბადშემცველ ნივთიერებებს სხვადასხვანაირად ითვისებენ შედარებით მისაღებია ნახშირწყლები, მრავალატომიანი სპირტები და ორგანული მჟავეები. მიკროორგანიზმები ადვილად ითვისებენ მონოსაქარიდებს – გლუკოზას, ფრუქტოზას, მანოზას, ლაქტოზას და დისაქარიდებს – მალტოზას და საქაროზას (52, 56, 97, 164, 186). აღსანიშნავია, რომ პროდუცენტის ინტენსიურ ზრდას ყოველთვის არ შეესაბამება ფერმენტის მაქსიმალური სინთეზი.

ბევრი ავტორი აღნიშნავს, რომ გლუკოზა, რომელიც უზრუნველყოფს ბიომასის ნაზრდს, აფერხებს კარბოჰიდრაზების ფერმენტების ბიოსინთეზს (52, 56).

უმეტესობა მკვლევარებისა ცელულაზებსა და ამილაზებს მიაკუთვნებენ მკაცრად ინდუცირებად ფერმენტებს (1, 75, 177, 178), თვლიან რა, რომ მათი წარმოქმნა შესაძლებელია მხოლოდ, არეში სუბსტრატის, ან რაიმე სპეციფიკური ინდუქტორის არსებობისას (მაგ. სახამებელი, მალტოზა, ცელობიოზა, გლუკოზა, Solka floc", ავიცელი) (67, 148, 152, 164, 186, 191, 208, 255). კარბოჰიდრაზების სინთეზისათვის ინდუქტორს შეიძლება წარმოადგენდეს ფერმენტის სუბსტრატი, ან აგებულებით სუბსტრატის მსგავსი ნივთიერება (1, 9, 56, 71).

მაზურენკო და სხვ. აღნიშნავენ, რომ შტამ *A. orizae* T-33-ისათვის ნახშირბადის წყაროს წარმოადგენს 6% - სახამებელი ან დაჰიდროლიზებული სახამებელი (35).

უნდა აღინიშნოს, რომ სახამებლის ოპტიმალური რაოდენობა თითოეული ორგანიზმისთვის განსხვავებულია. მაგალითად *A.orizae* 3-9-15-ისათვის საკვებ არეში სახამებლის ოპტიმალური კონცენტრაციაა 5-6%, *A. niger* NRRL-337-ისათვის, *A. Batatae* 61-ისათვის და *A. usami*-3758/45-ისათვის სახამებლის შემცველობა არ უნდა

აღემატებოდეს 1,4-1,7%-ს (17). *A. niger*-147-ის არეში სახამებლის კონცენტრაციაა – 5% (39).

T. lanuginosus-ის საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროდ სახამებელის დამატებისას აღინიშნებოდა მაღალი α-ამილაზური და გლუკოამილაზური აქტივობა (191).

მრეწველობაში საკვები არის შემადგენლობაში ხშირად იყენებენ სახამებელშემცველ კომპონენტებს: სიმინდის ფქვილს, ხორბლისა და ბრინჯის ქატოს, კარტოფილის გადამუშავების ნარჩენებს, ალაოს ღივებს და სხვა (42, 55).

ზოგიერთი მიკროორგანიზმების საკვებ არეში ნახშირბადის წყარო შეიძლება შეცვლილი იქნას ორგანული მჟავეებით, თუმცა ამილაზური ფერმენტების ბიოსინთეზი ამ დროს მიმდინარეობს ძალიან სუსტად (51).

ბრაზილიის ნიადაგებიდან გამოყოფილი თერმოფილური სოკო - *Humicola grisea* var. *thermoidea*, ხასიათდებოდა გლუკოამილაზის უფრო მაღალი (2,5-3-ჯერ) აქტივობით ნახშირბადის წყაროდ მალტოზის გამოყენებისას, ვიდრე სახამებელისა. როცა არის pH 5.0-ისა და ტემპერატურა 60^{0}C-ის ტოლი იყო (191, 255).

Aspergillus fumigatus-ის მიერ პროდუცირეული თერმოსტაბილური გლუკოამილაზა, მაქსიმალურ აქტივობას ავლენდა pH 4.5-5.5 და 65^{0}C ტემპერატურის პრობებში. ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროებზე კულტივირებისას, აღმოჩნდა, რომ უფრო მაღალ აქტივობას ავლენდა, როდესაც საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროდ შეტანილი იყო სახამებელი, გლიკოგენი, ამილოპექტინი და ამილოზა (97).

თერმოფილური შტამი *Clostridium sp.*, რომელიც კარგად იზრდება სხვადასხვა შაქრებსა და ორგანულ მჟავებზე, ცელულაზის სინთეზს ახორციელებდა მხოლოდ იმ შემთხვევებში, როდესაც საკვები არე შეიცავდა უხსნად ცელულოზას ან კმც-ს (186).

Myceliopthora thermophile-ს ცელულაზური კომლექსის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ. რომ ის წარმოქმნის ამ კომპლექსის ყველა კომპონენტს და ახდენს ცელულოზური სუბსტრატების ჰიდროლიზს, სოკოს კულტურა 30-90 დღის განმავლობაში 50^{0}C პირობებში ახდენს ორგანული ნახშირბადის მნიშვნელოვანი ნაწილის უტილიზაციას, ამავე დროს საკვებ არეში იზრდება აზოტის, ფოსფორისა და კალიუმის რაოდენობა. შაქრების ყველაზე დიდი რაოდენობა კულტურალურ სითხეში აღინიშნება კმც-ს, შედარებით ნაკლები ფილტრის ქაღალდისა და ყველაზე

ცოტა ბამბის ჰიდროლიზის დროს. კმც-ს ჰიდროლიზის ოპტიმალური ტემპერატურაა 70^0C, pH-4.8; ფილტრის ქაღალდისა - 70^0C, pH-4,2; ბამბის - 55^0C, pH-4.6 (234, 235).

საკვები არის ძალზე მნიშვნელოვან კომპონენტს ნახშირბადთან ერთად წარმოადგენს აზოტის წყარო, კარბოჰიდრაზების პრიდუცენტი მიკრომიცეტების კულტივირებისათვის იყენებენ აზოტის როგორც ორგანულ, ისე არაორგანულ წყაროებს.

Aspergillus orizae 3-9-15-ის α-ამილაზას ბიოსინთეზისათვის საუკეთესო აზოტის წყაროდ ითვლება $NaNO_3$ (19), ხოლო შტამ *A. Awamori*-ის გლუკოამილაზას ბიოსინთეზისათვის კი _ $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 და $NaNO_3$ (37). G

გლუკოამილაზას პროდუცენტი *Aspergillus Awamori* 224-21-ის კულტივირებისას საკვებ არეში აზოტის წყაროდ გამოიყენება, როგორც ამონიუმის მარილი, ასევე ნიტრატიც $NaNO_3$ და $(NH_4)_2HPO_4$ (42), ხოლო ობის სოკო *Aspergillus Awamori* 22-ის გლუკოამილაზას ბიოსინთეზისათვის არეს ემატება $(NH_4)_2SO_4$ (11).

საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროს ოპტიმალური კონცენტრაციის დადგენა ხდება აზოტის წყაროს გარკვეული რაოდენობის ფონზე, რაც აუცილებელია მიკროორგანიზმების ცხოველქმედებისათვის (13).

საუკეთესო აზოტის წყაროს თერმოფილური შტამების _ *Aspergillus terreus* 17p და *Aspergillus terreus*-490 ცელულაზებისათვის წარმოადგენს ნიტრატული აზოტი (6, 23, 26) მსგავსი მონაცემები იქნა მიღებული ცელულაზების პროდუცენტებზე *Phoma glomerata* და *Rizoctonia solani* (122).

ზოგიერთი მკვლევარის აზრით ცელულაზებისა და ამილაზების პროდუცენტები წარმატებით ითვისებენ როგორც ორგანულ, ისე არაორგანულ აზოტს. მაგალითად ცელულაზის პროდუცენტი ალკალიტოლერანტული შტამი *Fusarium* sp. სათვის, აზოტის არაორგანული წყაროებიდან საუკეთესო აღმოჩნდა ამონიუმის სულფატი, ხოლო ორგანული წყაროებიდან – საფუვრის ექსტრაქტი (260). ჰალოტოლერანტული სოკოს – *Penicillium fellutanum*-ის α-ამილაზასათვის საუკეთესო აზოტის წყარო წარმოდგენდა პეპტონი, თუმცა საკმაოდ მაღალ აქტივობას ავლენდა, სხვა ორგანულ აზოტის წყაროების შემცველ არეებზე კულტივირებისასაც

(148, 164, 208). აზოტის ორგანული წყაროების შეტანა არეში საჭიროა მცირე რაოდენობით მინერალურ ფორმებთან ნარევში (38, 137, 140, 260).

ზოგიერთი მიკროსკოპული სოკოსათვის, აზოტის საუკეთესო წყაროს, წარმოადგენენ ამინომჟავები. მაგალითად, *Aspergillus Awamori* 78-2-ის გლუკოამილაზას ბიოსინთეზის სტიმულირება მიმდინარეობს თიროზინისა და ალანინის, გლუტამინისა და ასპარგინის ამინომჟავეების დახმარებით. აღსანიშნავია, რომ ზოგი ამინომჟავა ფენილალანინი, ჰისტიდინი, გლიცინი და სხვა. აფერხებენ ფერმენტების სინთეზს (31).

Trichoderma lignorum 19 აქტიურად ასინთეზებს ცელულაზებს ასპარაგინიან, ვალინიან და გლუტამინმჟავიან არეებზე (50) თერმოტოლერანტული შტამი *Aspergillus terreus* 17p ცელულაზებს წარმოქმნიდა შესწავლილი 18 ამინომჟავიდან მხოლოდ ლეიცინის, არგინინის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის დამატებისას საკვებ არეში (23). ცელულაზების წარმოქმნის სტიმულირებას ზოგიერთ მიკროორგანიზმებში იწვევენ საფუვრის ექსტრატი, ალაოს ღივები, მიკროორგანიზმების ბიომასა ან მისი ავტოლიზატები და ფერმენტოლიზატები. (23, 53).

ლიტერატურაში არსებობს მონაცემები, რომელთა მიხედვით სიმინდის ექსტრაქტის დმატებით შეტანა საკვებ არეში დადებით გავლენას ახდენს ცელულაზების წარმოქმნაზე, მაგ.: *Aspergillus terreus* 17p, *Aspergillus terreus* AT-490 და *Sporotrichum pulverulentum*-ის საკვებ არეებში სიმინდის ექსტრატის შეტანა იწვევს ცელულაზების სინთეზის გაზრდას (6, 23, 26).

მრავალი მკვლევარის მიერ იქნა შესწავლილი თერმოფილური შტამი *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosus*-ი, რომელიც სახამებლის შემცველ არეში აწარმოებდა, როგორც ა-ამილაზის ასევე გლუკო-ამილაზის სინთეზს. სიღრმული კულტივირებისას, როდესაც არეში შეჰქონდათ ,,Tween 80", კულტურის მიერ პროდუცირებული ა-ამილაზური აქტივობა იზრდებიდა 2,7-ჯერ (78, 191).

ნიადაგიდან გამოყოფილი *Aspergillus*-ის გვარის მიკროსკოპული სოკო, რომელიც იზრდებოდა 30^{0}C, pH 4.5 დროს, საკვებ არეში საფუვრის ექსტრაქტის დამატების შედეგად ავლენდა მაღალ გლუკოამილაზურ აქტივობას (254).

ფერმენტების ბიოსინთეზში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ფოსფორი. ფოსფორის როლი მეტაბოლიზმის პროცესში, იმით განისაზღვრება, რომ იგი წარმოადგენს უჯრედის აუცილებელ შემადგენელ ნაწილს. მიკროორგანიზმები მას ადვილად ითვისებენ. არეში ფოსფორის დიდი რაოდენობით არსებობის დროსაც კი ხდება, მისი სწრაფი გამოყენება (209).

ავტრების დიდი ნაწილი მიიჩნევს, რომ ამილაზებისა და ცელულაზებისათვის ოპტიმალურ წყაროს ერთჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმი წარმოადგენს (6, 23).

ფოსფორის წყაროების, ფოსფორმჟავა მარილების შეთვისება ხდება მაღალი კონცენტრაციით. მისი კონცენტრაციის გაზრდისას 0,075-დან 0,1% - მდე, იზრდება სახამებლის მოხმარებაც და ბიომასის შესაბამისი ზრდაც (30).

ამილაზების პროდუცენტი თერმოფილური შტამის *Thermomyces lanuginosus*-ის კულტივირებისას საკვები არის შემადგენლობაში ფოსფორის წყაროს წარმოადგენდა K_2HPO_4 0.1%-ის შემცველობით. (191, 198).

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

ქრისტენსენი (109) თვლის, რომ მიკროორგანიზმების უმეტესი ნაწილის ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა 30^0C.

α-ამილაზის პროდუცენტი *Penicillium fellutanum*-ის კულტივირების პირობების შესწავლისას ფერმენტის მოქმედების მაქსიმალური აქტივობა გამოვლინდა 30^0C ტემპერატურაზე, pH 6.5-ის პირობებში. (148, 164, 208).

ბილაი აღნიშნავს, რომ *Aspergillus*-ის გვარის წარმომადგენლები სითბოს მოყვარულები არიან (10). კვესიტაძემ და სხვებმა შეისწავლეს, თუ რა გავლენას ახდენს კულტივირების ტემპერატურა *Aspergillus* გვარის ზოგიერთი მუტანტური შტამიდან გამოყოფილი გლუკოამილაზას ბიოსინთეზზე. ნაჩვენებია, რომ ოპტიმალური ტემპერატურა მუტანტების *A. niger* 147-A, *A. Awamori* 466 და *A. Awamori* T-I კულტივირებისათვის, რომელიც უზრუნველყოფს გლუკოამილაზას მაქსიმალურ ბიოსინთეზს, შესაბამისად ტოლია 30^0C, 35^0C და 40^0C (28). *Aspergillus fumigatus*-ის ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონი კი საკმაოდ დიდია 25-50^0C-მდე (10).

ცელულაზების პროდუცენტი თერმოფილური კულტურა *Chaetomium thermophile* აქტიურია და სტაბილურობას ინარჩუნებს 60^0C ტემპერატურაზე (76, 204).

თერმოფილური შტამის *Scytalidium thermophilum*-ის მიერ წარმოებული α-ამილაზასათვის ოპტიმალური pH 6.0-ის ტოლია, ოპტიმალური ტემპერატურა კი - 50-60^{0}C-ის დიაპაზონშია. ფერმენტი 50^{0}C-ზე, 1 საათის განმავლობაში ინარჩუნებდა აქტივობას (75).

მიკროორგანიზმების ცხოველქმედების პროცესზე ასევე დიდ გავლენას ახდენს არის მჟავიანობა.

კურსანოვი თვლის რომ, (33) სოკოების ზრდისათვის ოპტიმალურია ნეიტრალური და ნეიტრალურთან მიახლოებული მჟავე გარემო პირობები pH 4.5-6.5. ამილაზური ფერმენტებისათვის ოპტიმალურად ითვლება ნეიტრალური pH-ი 5.0-6.0 (214). *Penicillium chrysogenum*-ი მაღალ α-ამილაზიურ აქტივობას ავლენდა pH 5.0-ზე, ოპტიმალური ტემპერატურის – 30-40^{0}C-ის პირობებში. 30^{0}C-ზე ინკუბაციისას ფერმენტი აქტივობას ინარჩუნებდა 20 წუთის განმავლობაში, არეში ნახშირბადის წყაროს წარმოადგენდა მალტოზა (94).

გლუკოამილაზას ბიოსინთეზისათვის ოპტიმალურად ითვლება pH 4.0-5.5, თუმცა ექსტრემოფილური კულტურებისათვის ოპტიმალური პირობები განსხვავებულია: აციდოფილური შტამი *A. niger* 147-ი გლუკოამილაზას მაქსიმალური აქტივობას ავლენს, როცა არის pH 2.0-3.0-ის ტოლია (39, 74, 114). ალკალიფილური კულტურის *Aspergillus orizae*-ეს მიერ ამილაზების სინთეზი წარმოებს მხოლოდ ტუტე გარემოში pH 7.2-ის პირობებში (273).

ასევე ითვლება, რომ ცელულაზები აქტივობას ამჟღავნებენ ძირითადად ნეიტრალურ და მჟავე არეში pH 4.5-5.0 (260). თერმო-აციდოფილური კულტურა *Thermoascus aurantiacus*-ი მაღალ ცელულაზურ აქტივობას ავლენს pH 2.9-4.5-ზე 65-76^{0}C ტემპერატურაზე (76, 204).

შტამ *Fusarium* sp.-სათვის, რომელიც ტუტესტაბილური ცელულაზის აქტიური პროდუცენტია, ოპტიმალური pH 8.0-10.0-ის ტოლია, 60^{0}C ტემპერატურის პირობებში (260).

სიღრმული კულტივირებისას საკვებ არის pH იცვლება ნივთიერებათა ცვლის პროცესში. საკვებ არის ყველა კომპონენტების დისოციაციის ხარისხი კი დამოკიდებულია pH-ზე. რიგ შემთხვევებში კი მიკროორგანიზმები ახდენენ არის მჟავიანობის თვითრეგულაციას (8).

ამდენად, მოსაზრება, რომ აციდოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები აუცილებლად უნდა ხასიათდებოდნენ მაღალი მჟავე სტაბილურობით, ჩვეულებრივ პირობებში მზარდი მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებულ ფერმენტებთან შედარებით ყოველთვის არ არის მართებული. (237) მიუხედავად ამისა არსებობს მეტი ალბათობა იმისა რომ, აციდოფილური მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები ხასიათდებოდნენ შედარებით მაღალი მდგრადობით საინკუბაციო არის მჟავიანობის მიმართ.

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

ვიქტევმა და სხვებმა შეისწავლეს თუ რა გავლენას ახდენდა ჩასათესი მასალის ასაკი *A.niger*-ის გლუკოამილაზას ბიოსინთეზზე. გლუკოამილაზას ყველაზე მაღალი აქტივობა აღინიშნებოდა, როდესაც გამოყენებული იქნა 6-12 დღიანი სპოროვანი მასალა. ჩასათესი მიცელიუმი კი საუკეთესო იყო 24-30 საათის (259).

შესწავლილია *A. niger* 475-ის მჟავა მედეგი α-ამილაზას და *A. niger* NRRL 337-ის გლუკოამილაზას ბიოსინთეზზე ჩასათესი მასალის ასაკის გავლენა, ამ შემთხვევაში საუკეთესო აღმოჩნდა 20 დღიანი კულტურა (39).

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ჩასათესი მასალის სპოროვანით შეცვლისას კულტივირების ხანგრძლივობა 24 სთ-ით მცირდება (24).

ფერმენტების ბიოსინთეზზე არანაკლებ გავლენას ახდენს აერაცია, კულტივირების ხანგრძლივობა და კულტურების შენახვის პირობები (1, 10, 15, 27, 28, 29, 164, 208, 260).

ფერმენტების კულტივირება ძირითადად მიმდინარეობს სიღრმული კულტივირებისას, მაგრამ ზოგ შემთხვევაში გამოიყენება ზედაპირული ან მყარფაზოვანი კულტივირების მეთოდები. სიღრმული კულტივირებისას უფრო ხშირად ჩვეულებრივ პერიოდულ კულტივირებას ხოლო საწარმოო პირობებში უფრო მისაღებია უწყვეტი ან ნახევრად უწყვეტი კულტივირება (15, 70, 260) ცელულაზური ფერმენტების პროდუცენტებისათვის ოპტიმალურად ითვლება 4 დღე (96სთ) – სიღრმული კულტივირებისათვის (250მლ ერლენ-მეიერის კოლბაში).

ტუტესტაბილური ცელულაზის პროდუცენტი შტამი *Fusarium* sp., მაქსიმალირ აქტივობას ავლენდა 96 სათიანი კულტივირების შედეგად.

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

სტაბილური ფერმენტების მიღება კი ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი პრობლემა ბიოტექნოლოგიასა და ფერმენტულ ტექნოლოგიაში.

ექსპერიმენტული ნაწილი

თავი II

კვლევის მასალები და მეთოდები:

2.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა.

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

მიკროსკოპული სოკოების კულტურების გამოსაყოფად თავდაპირველად აღნიშნული ზონებიდან ავიღეთ 10-10 გასაშუალებული ნიმუში. (ნიადაგების ნიმუშები აღებულია 50სმ რადიუსში - ხუთი სხვადასხვა ადგილიდან, 15სმ სიღრმიდან) (Фомин, 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 მეთოდითა (Waksman, 1916.) და ნიადაგის პირდაპირი ჩათესვის მეთოდით (Warcup, 1950.). ვიღებდით შემდეგ განზავებებს - 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 - იმისათვის რომ სუსპენზიის თითოეულ თავისუფლად მოცურავე უჯრედს საკვებ არეზე მოხვედრისას მოეცა კოლონია. შევარჩიეთ სელექტიური საკვები არეები სხვადასხვა პრინციპით.

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

2. საკვები არეები, რომლებიც შეიცავენ სპეციფიკურ ქიმიურ ნაერთებს (ზრდის ინჰიბიტორებს) და არატოქსიკურ ნივთიერებებს, რომლებიც მეტაბოლიზმში მონაწილეობას არ იღებენ, მაგრამ ცვლიან არის პირობებს (მჟავიანობას, ტუტიანობას). ზემოთ აღნიშნული პრინციპების შესაბამისად შერჩეულ იქნა 6 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 %: $NaNO_3$-0,91, KH_2PO_4-0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4 \cdot H_2O$-0,002, გლუკოზა-2,0, აგარ-აგარი-2,0. (pH 3.5-4.0)
3. ჩაპეკ-დოქსის არე – შემადგენლობა %: საქაროზა-3,0, $NaNO_3$-0,2, K_2HPO_4-0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-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).

6. ჩაპეკის მოდიფიცირებული არე - შემადგენლობა %: $NaNO_3$-9.1, KH_2PO_4-1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0.5, KCl-0.5, $FeSO_4$-0.02, სახამებელი-0,2, აგარ-აგარი-2,0 (pH 5.5-6.0).

სტერილიზაციის რეჟიმი იყი 0,7 ატმ, 40წთ. კულტივირებას ვაწარმოებდით 28^0-30^0C-ზე.

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

მათ მისაღებად პეტრის თასებზე განვითარებულ ცალკეულ კოლონიების ამოთესვას ვიწყებდით ინკუბაციის მე-5 დღეს აღნიშნულ საკვებ არეებზე. სუფთა კულტურების გამოყოფას ვაწარმოებდით მარყუჟის მოხრილი წვერით, რომლის საშუალებით ფრთხილად გადაგვქონდა მიცელიუმის ნაგლეჯი საკვებ არეზე, მჭიდრო სპორომატარებლობისას სპორების მინიმალური რაოდენობა თავსდებოდა საკვებ არეზე. გამოყოფილი სუფთა კულტურები გადაგვქონდა აგარიზებულ საკვებ არეებიან სინჯარებში. კულტივირებას ვაწარმოებდით 28^0-30^0C-ზე 10 დღის განმავლობაში. უკვე გასუფთავებულ კულტურებს ვინახავდით მაცივარში 4^0C-ზე.

გავრცელებული მიკროსკოპული სოკოების რაოდენობაზე ვმსჯელობდით კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულის განსაზღვრით (კწე) 1გრ. მშრალ ნიადაგზე გადაანგარიშებით, ფორმულა A=abv/g (Дудка и др 1982).

ცალკეული გვარის შეხვედრის სიხშირეს ვსაზღვრავდით ფორმულით:

ნიმუშების რაოდენობა, სადაც გამოვლენილია
მოცემული გვარი

გვარის შეხვედრის სიხშირე = _____

ნიმუშების საერთო რაოდენობა

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

დასაწყისში (გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიცირებამდე) კულტურებს მინიჭებული ჰქონდა გამოყოფის ადგილმდებარეობის პირველი ასო (თელავი-T; რაჭა-R და ა.შ.) და ციფრი, (დანომვრის მიხედვით).

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

მიკროსკოპული პრეპარატის დასამზადებლად, გასტერილებული მარყუჟის წვერით ვჭრიდით სოკოების კოლონიების ნაწილს, რამდენადაც შესაძლებელი იყო საკვები არის აგარის გარეშე, ვათავსებდით წყლის წვეთში, რომელშიც იხსნებოდა სპორები. ვინაიდან სოკოს ზოგიერთი ელემენტი, ძირითადად სპორები და კონიდიები არ სველდება წყლით, წყალს ვამატებდით ეთილის სპირტს 1:1 ან კონცენტრირებულ ძმარმჟავას. ასევე ვამზადებდით პრეპარატ-ანაბეჭდს, აგარიზებული საკვები არიდან ვჭრიდით დაახლოებით 10 მმ დიამეტრის კოლონიას, რომელსაც ვათავსებდით სასაგნე მინაზე კოლონიით ზევით, ფრთხილად და მჭიდროდ ზემოდან ვაფარებდით სტერილურ საფარი მინას. შემდეგ საფარ მინას ვდებდით სასაგნე მინაზე, რომელზეც წინასწარ დაწვეთებული გვქონდა წყალი ან მეთილენის ლურჯი. მზა პრეპარატის კვლევას ვახდენდით მშრალი ოპტიკური სისტემით.

იდენტიფიცირებისათვის გამოვიყენეთ საკვლევები, (Пидопличко, Милько, 1971.); (Билай, Коваль, 1988.); (Литвинов, 1967.); (Malloch, et al. 1981.).

2.3 α- და გლუკო-ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით)

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.

კულტივირების შემდეგ კულტურალურ სითხეს ვაცენტრიფუგებდით 4000 ბრ/წთ-ზე. კარბოჰიდრაზების აქტივობას ვსაზღვრავდით კულტურალური სითხის ცენტრიფუგატში, რადგან წინასწარი ცდებით დადგენილ იქნა, რომ ფერმენტები კონცენტრირებულია ძირითადად სითხეში, ბიომასაში კი რჩება მხოლოდ 5-10%.

2.4 α-ამილაზური აქტივობის განსაზღვრა

კულტურალური სითხის ცენტრიფუგატში, ვსაზღვრავდით α-ამილაზის აქტივობას, ფერმენტული რეაქციის შედეგად მიღებული იოდ-სახამებლის ფერად რეაქციაზე დამყარებული რუხლიადევასა და გორიაჩევას მეთოდით (Рухлядева, Горячева 1960).

α-amilazas aqtivobis erTeulad miRebulia fermentis iseTi raodenoba, romelic iwvevs 1 g saxameblis hidrolizis katalizs 30^0C-ze 1 sT-is ganmavlobaSi.

aqtivobas vsazRvravdiT Semdegnairad: 30^0C-is pirobebSi TermostatSi Cadgmul sinjaraSi 10ml substrats (1%-iani xsnadi saxamebli) vumatebdiT 4ml gamoxdili wyals da 1ml fermentul xsnars. 10 wuTi inkubaciis Semdeg sinjaridan amogvqonda 0,2 ml xsnari da vumatebdiT winanwar gamzadebul 10 ml iodis samuSao xsnars.

პარალელურად, თერმოსტატში კონტროლად ჩადგმული სინჯარიდან (რომელშიც 10მლ სუბსტრატი და 5მლ გამოხდილი წყალია), აგრეთვე ამოგვქონდა 0,2 მლ ხსნარი და ვუმატებთ 10 მლ იოდის სამუშაო ხსნარს. ხსნარების შეფერილობის ინტენსივობას, რაც დამახასიათებელია იოდ-სახამებლის რეაქციისათვის და

დამოკიდებულია სახამებლის ჰიდროლიზის ხარისხზე, ვზომავდით 650 ნმ-ზე (λ=650 კონტროლის ოპტიკური სიმკვრივე)

hidrolizebuli saxameblis raodenobas vsazRvravdiT Semdegi formuliT:

$$C = \frac{D_1 - D_2}{D_1} * 0.1 \text{ გ}$$

DD_1 _ კონტროლის სიმკრივე

D_2 _ საკვლევი ხსნარის სიმკვრივე

C _ ჰიდროლიზებული სახამებლის რაოდენობა რეაქციის პროცესში

α-ამილაზას აქტივობა გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$AC = \frac{7.264*C - 0.03766}{} *1000 \text{ ერთ/გრ}$$

2.5 გლუკოამილაზური აქტივობის განსაღვრა

სიღრმული კულტივირების შემდეგ, კულტურალური სითხის ცენტრიფუგატში ვსაზღვრავდით გლუკოამილაზურ აქტივობას მეთოდით, რომელიც დამყარებულია ხსნადი სახამებლის ჰიდროლიზის დროს, ფერმენტ გლუკოამილაზას მოქმედების შედეგად წარმოქმნილი გლუკოზის განსაზღვრაზე.

გლუკოამილაზური აქტივობით ხასიათდება, ფერმენტული პრეპარატის შესაძლებლობა, მოახდინოს ხსნადი სახამებლის ჰიდროლიზის კატალიზი გლუკოზამდე და გამოიხატება რიცხვითი ერთეულით გრამ პრეპარატში.

ფერმენტული რეაქციის შედეგად წარმოქმნილ გლუკოზის რაოდენობას ვსაზღვრავდით დალგვისტის მეთოდით (Dahlguist, 1961).

სუბსტრატად ვიყენებდით 1%-იანი ხსნადი სახამებლის ხსნარს აცეტატურ ბუფერში (pH 4.7). აღნიშნული სუბსტრატის 10მლ-ს ვუმატებდით 4მლ გამოხდილ წყალს და 1მლ ფერმენტულ ხსნარს. სინჯარას ვათავსებდით თერმოსტატში 30^0C-ზე. 10წთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ 1მლ ფერმენტულ ხსნარს ვასხამდით ცარიელ

სინჯარაში. სადაც ვახდენდით ფერმენტის ინაქტივაციას, მდუღარე წყლის აბაზანაში მოთავსებით 2წთ-ის განმავლობაში.

პარალელურად ძირითადი ფერმენტული ხსნარიდან ვიღებდით 5-5მლ ხსნარს. 20წუთი ინაქტივირების შემდეგ, იგივე პროცესს ვიმეორდებდით, რათა თითოეულ სინჯარისათვის გვქონოდა თავისი კონტროლი.

საკვლევი ხსნარის გაცივების შემდეგ, სინჯარაში ვუმატებდით 3მლ სამუშაო ხსნარს (გლუკოზოოქსიდაზურ-პეროქსიდაზური რეაქტივი), ვაყოვნებდით და ვზომავდით ოპტიკურ სიმკვრივეს 420ნმ-ზე (λ=420).

გლუკოამილაზას აქტივობის ერთეულად მიღებულია ფერმენტის ისეთი რაოდენობა, რომელიც ხსნად სახამებელზე მოქმედებისას წარმოქმნის 1 მიკრომოლ გლუკოზას 1წთ-ის განმავლობაში, pH 4.7 და 30^{0}C ტემპერატურის პირობებში.

გლუკოამილაზას აქტივობა (ერთ/გ ან ერთ/მლ) ისაზღვრება შემდეგი ფორმულით:

$$C=\frac{a*b*15}{n*180*10}$$

n – ფერმენტული ხსნარის რაოდენობა.

a – გლუკოზის ნამატი სტანდარტული მრუდით.

b – განზავების კოეფიციენტი.

10 - ჰიდროლიზის დრო, წთ;

180 – გლუკოზის მოლეკულური მასა (მიკროგრამის მიკრომოლში გაანგარიშებით).

2.6 საერთო ცელულაზური აქტივობის განსაზღვრა ფილტრის ქაღალდის მიხედვით

საერთო ცელულაზურ აქტივობას ვსაზღვრავდით ცნობილი მეთოდით (Ghose, 1987.), რომელიც დაფუძნებულია ცელულაზის უნარზე, მოახდინოს უხსნადი სუბსტრატების (კერძოდ, ფილტრის ქაღალდის) ჰიდროლიზი ხსნად ოლიგო- და მონოსაქარიდებამდე. აღმდგენელ შაქრებს ვსაზღვრავდით სომოჯი-ნელსონის მეთოდით (Nelson, 1944; Somogyi, 1952.).

სარეაქციო არეს ვამზადებდით შემდეგნაირად: 50მგ ვატმანის №1 ფილტრის ქაღალდს, ვჭრიდით 1X6სმ ზომაზე, ვკეცავდით გარმონისებურად. შემდეგ ვათავსებდით სინჯარაში, და ვამატებდით 1მლ აცეტატურ ბუფერს (0.05 M, PH 4.6). სინჯარებს ვაცხელებდით თერმოსტატში 60^0C-ზე 5წთ-ით, შემდეგ ვუმატებდით 1მლ კულტურალური სითხეს (რომელიც წინასწარ განვაზავეთ გამოხდილი წყლით 1/5-თან შეფარდებით). ინკუბაციას ვაწარმოებდით თერმოსტატში 1საათის განმავლობაში. ამის შემდეგ სინჯარებიდან ვიღებდით 1მლ საანალიზო ხსნარს და ვუმატებდით 1მლ სომოჯის რეაქტივს, გადაგვქონდა მადუღარ აბაზანაში, ვაჩერებდით 20წუთი (დუღილის დროს სინჯარებს თავზე მორგებული ჰქონდათ წვეთდამჭერები). 20წუთი დუღილის შემდეგ სინჯარებს ვაცივებდით ცივ წყალში, რის შემდეგაც ვუმატებდით ნელსონის რეაქტივს 1მლ-ის ოდენობით, შემდეგ თითოეულ სინჯარას ვასხამდით 7-7მლ გამოხდილ წყალს.

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

ოპტიკურ სიმკვრივეს ვზომავდით 597 ნმ ტალღაზე.

საერთო ცელულაზურ აქტივობას ვანგარიშობდით შემდეგი ფორმულით:

$$A = \frac{\text{ა. შ.}}{t * E} -$$

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

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

t – ინკუბაციის დრო წუთებში

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

2.7 კულტურების პათოგენურობის დადგენა

მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ზოოპათოგენურობის განსაზღვრას ვახდენდით კურდღლის ვენაში სოკოს სუსპენზიის შეყვანით (Ohga, et al 1966).

ფიზიოლოგიურ ხსნარით ვამზადებდით სოკოს კულტურის სუსპენზიას ისე, რომ განზავების მიხედვით მიგვეღო ორი დოზა: 250 და 500 ათასი უჯრედი 1მლ-ში. ასეთი ფიზიოლოგიური ხსნარი შეგვყავდა კურდღლის ვენაში და ცხოველის რეაქციას

ვსწავლობდით კლინიკური დაკვირვებით, პათანატომიური გაკვეთების, ორგანოების მიკროსკოპული და მიკოლოგიური შესწავლის გზით.

პათანატომიური გაკვეთებისა მიკროსკოპული გამოკვლევების დროს ძირითადი ყურადღებას ვაქცევდით სოკოს განვითარებას ორგანოებში. მიკოლოგიური ანალიზისათვის სპირტქურის ალზე გატარებული ღვიძლიდან და თირკმლიდან ვიღებდით ანათლებს ვათავსებდით აგარის ზედაპირზე ჩაპეკის არიან პეტრის თასებში.

კულტივირებას ვახდენდით 40^{0}C-ზე 10 დღის განმავლობაში.

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.

2.8 ტოქსიკურობის განსაზღვრა კურდღელზე კანის სინჯის მიხედვით

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

სოკოების კულტივირებისათვის, ხორბლის მარცვალი შეგვქონდა 1,5ლ მოცულობის ბრტყელკედლებიან ჭურჭელში 100–200გ ოდენობით. ვნამავდით წყლით და ვასტერილებდით 1ატმ-ზე 40წუთის განმავლობაში. სოკოს კულტურებიან სინჯარებში ვამატებდით 3-5მლ სტერილურ წყალს, ჩამოვრეცხავდით კონიდიებს და სპირტქურის ალზე გადაგვქონდა ჭურჭელში, სადაც მოთავსებული იყო გასტერილებული ხორბლის მარცვლები. ნათესს ვათავსებდით თერმოსტატში და ვზრდიდით 40^{0}C-ზე 15 დღის განმავლობაში. შემდეგ 4-5 დღე ვაჩერებდით ოთახის ტემპერატურაზე. ტოქსიკური ნივთიერებების უკეთესად დაგროვებისათვის ყოველ ორ დღეში ერთხელ კარგად ვურევდით. სოკოს კარგად განვითარების შემთხვევაში ხორბლის მარცვლებს ვიღებდით ჭურჭლიდან, ვათავსებდით ფილტრის ქაღალდისაგან დამზადებულ პარკებში და ვაშრობდით 40^{0}C-ზე. შემდეგ 50გ-ს

ვფქვავდით და ვასხამდით გოგირდის ეთერს. Eექსტრაქცია გრძელდებოდა 24სთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. ექსტრაქტს ვფილტრავდით და ვაორთქლებდით ამწოვ კარადაში გამხსნელის სრულ აორთქლებამდე. მიღებულ ცხიმისებურ მასას ორჯერ 24სთ-ის ინტერვალით ვუსმევდით კურდღელს წინასწარ დამუშავებული კანის ზედაპირზე (4-5სმ^2). კანის რეაქციას ვსწავლობდით სპეცივსევას მიერ შემოთავაზებული მეთოდით (Спесивцева, 1971).

2.9 ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა

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

ტემპერატურულ საზღვრების ვადგენდით მიკროსკოპული სოკოების გაზრდით 5-55^0 C-მდე, 5^{0}C-ის ინტერვალით.

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

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

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

2.10 კარბოჰიდრაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება

ფერმენტული პრეპარატების მისაღებად კულტურალური სითხის ფილტრატს ვაციებდით 4^{0}C-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.

2.11 ფერმენტული პრეპარატების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმების დადგენა

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 0,05M აცეტატურ ბუფერში, pH 4.7. ამილაზების შემთხვევაში სუბსტრატად ვიყენებდით 1%-იან სახამებლის ხსნარს, იგივე ბუფერულ სისტემაში.

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

თავი III

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა:

3.1 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა

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 კულტურების რაოდენობრივმა ანალიზმა, გვიჩვენა:

მშრალი სუბტროპიკული კლიმატური და სტეპების ზონის მიკოფლორა გაცილებით მრავალრიცხოვანია და ამასთანავე მრავალფეროვანი. მრავალრიცხოვანია ასევე კონტინენტალური კლიმატური ზონა, მაგრამ შედარებით ერთფეროვანი. ალპური და სუბალპური ზონების მოკოფლორა მრავალფეროვანია, მაგრამ მცირერიცხოვანი. ტენიანი სუბტროპიკული კლიმატური ზონის მიკოფლორა ერთფეროვანი და მცირერიცხოვანია. ნახევრად უდაბნოს ზონის მიკოფლორაც მწირია.

ნიადაგიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები იზრდებოდა თერმოსტატში 30^0 C-ზე. პეტრის თასებზე ჩათესილი ნიადაგის ნიმუშების დათვალიერება და აღწერა ხდებოდა მე-3, მე-5, მე-7 და მე-10 დღეს. პირდაპირი განზავების მეთოდით ნიადაგების ნიმუშების დათესვისას ოპტიმალური აღმოჩნდა $1/10^2$ და $1/10^3$ განზავებები.

ნიადაგის ნიმუშის პეტრის თასებზე დათესვის შემდეგ მიღებული სურათი წარმოდგენილია 1-ელ სურათზე:

სურათი 1.

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

ნიადაგებიდან მიკოფლორის პირველადი გამოყოფის შემდეგ, პირველადი ჩანათესებიდან, გამოვყავით სუფთა კულტურები, მათ მისაღებად პეტრის თასებზე განვითარებულ ცალკეულ კოლონიების ამოთესვას ვიწყებდით ინკუბაციის მე-5 დღეს უნივერსალურ საკვებ არეზე, უკვე გასუფთავებულ კულტურებს ვინახავდით მაცივარში 4^0C-ზე.

საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილია მიკროსკოპული სოკოს 351 კულტურა. გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიცირებამდე, კულტურებს მინიჭებული ჰქონდა გამოყოფის ადგილმდებარეობის პირველი ასო (თელავი-T; რაჭა-R და ა.შ.) და ციფრი, (დანომვრის მიხედვით).

3.2 საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება

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

თავდაპირველად დავადგინეთ მსხვილი ტაქსონომიური ერთეული (კლასი, რიგი). ეს ერთეული განისაზღვრება რეპროდუქციული ორგანოებისა და აღნაგობის თავისებურებებით. არქსვონისა (Arxvon 1970) და კრეიზელის (Kreisel 1969) კლასიფიკაციაზე დაყრდნობით.

გამოყოფილი სუფთა კულტურების იდენტიფიცირებისათვის გამოვიყენეთ საკვლევები (Пидопличко, Милько, 1971.); (Билай, Коваль, 1988.); (Литвинов, 1967.); (Malloch, et al. 1981.). გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები მივაკუთვნეთ შემდეგ - Zygomicetes, Ascomycetes და Deiteromycetes კლასებს.

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

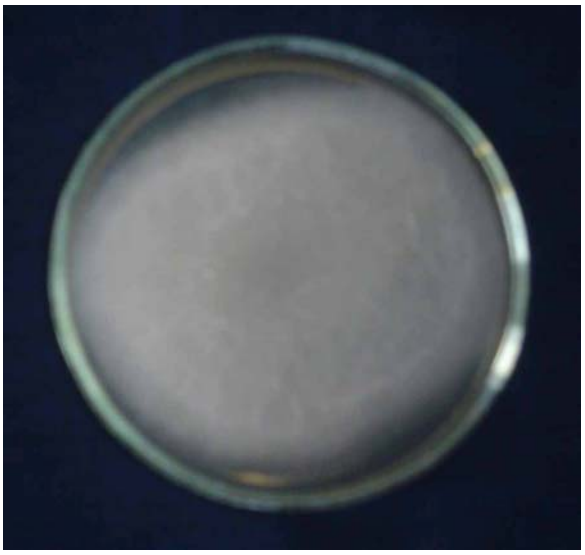
Ascomycetes კლასს მივაკუთვნეთ მიკროსკოპული სოკოების ის კულტურები, რომლებიც განვითარების ციკლში წარმოქმნიან ნებისმიერი ფორმისა და სიდიდის ჩანთებს. უფრო ხშირად ეს ჩანთები შეიცავენ 8 ასკოსპორას. რამდენადმე განსხვავებულია ამ კლასში შემავალი გვარების - *Penicillium*-ისა და *Aspergillus*-ის გვარის წარმომადგენლების გამრავლება. უსქესო გამრავლება - კონიდიებით, სქესობრივი გამრავლება - ჩანთებით. მხოლოდ ზოგიერთ წარმომადგენელს არ Aაღენიშნებოდა ჩანთების წარმოქმნა, ან თუ წარმოქმნიდნენ კლეისტოტეციების ტიპის ჩაკეტილ ნაყოფსხეულებში. ამ გვარის სახეობების იდენტიფიცირებისათვის დიდი მნიშვნელობა ენიჭებოდა კულტურალური თვისებების დადგენას. კერძოდ, კოლონიის ზრდის სიჩქარე, ფერი და სიდიდე, კიდეების და ცენტრის აღნაგობა, ზედაპირის ხასიათი, (ხავერდოვანი, ფუმფულა, ხაოიანი, ბეწვისებრი). რეპროდუქციული ორგანოების თავისებურება, კონიდიამატარებლობა, კონიდიების განლაგება. კოლონიის ჰაეროვანი ნაწილი (ვეგეტატიური მიცელიუმი, კონიდიალური თავები).

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

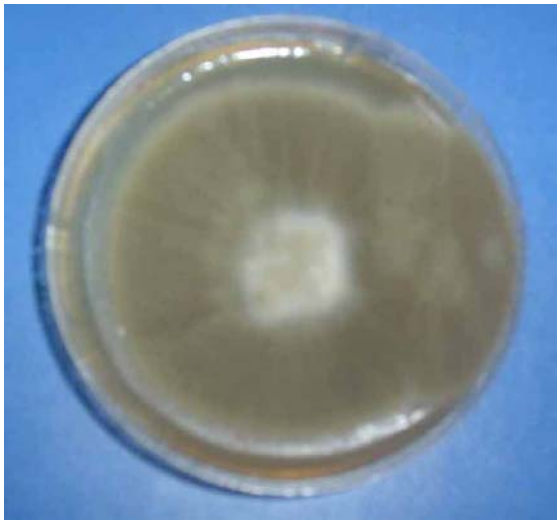
კულტურების კულტურალურ-მორფოლოგიური თვისებების დასახასიათებლად, ვახდენდით კულტურების დათვალიერებას პეტრის თასზე, მიკროსკოპის მცირე გადიდებით, შემდეგ კი ვამზადებდით პრეპარატებს აღნიშნული მეთოდებით.

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

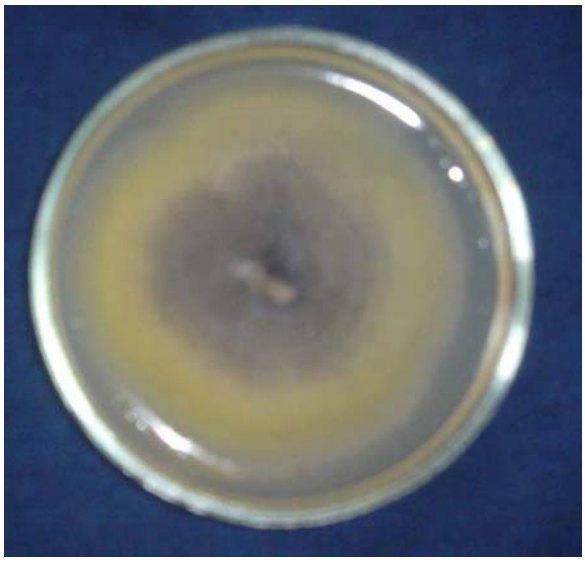
იდენტიფიცირებული სუფთა კულტურები წარმოდგენილია მე-2 სურათზე.



Mucor

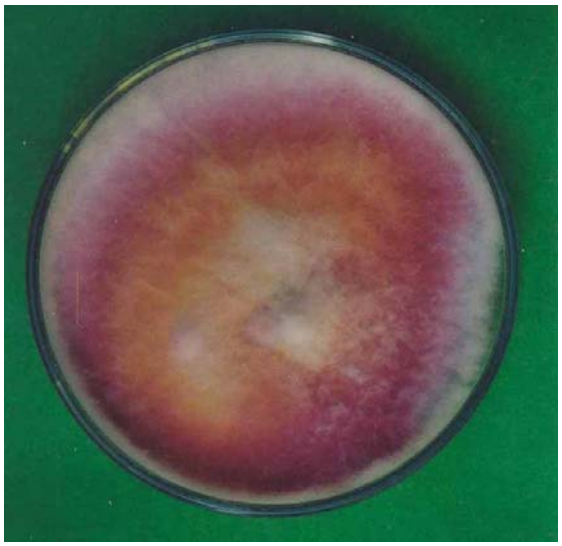


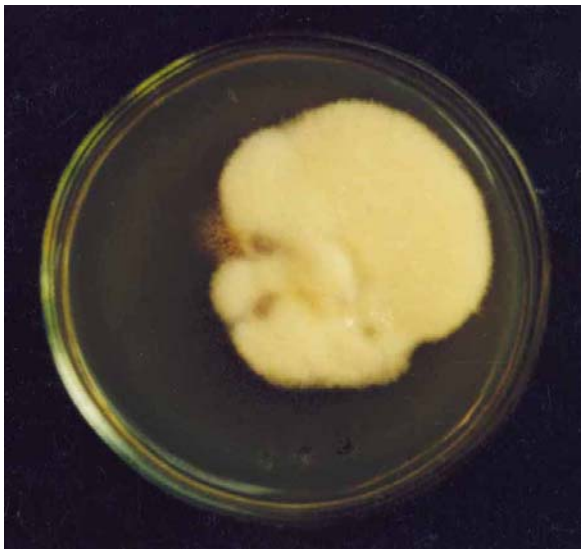
Penicillium



Absidia

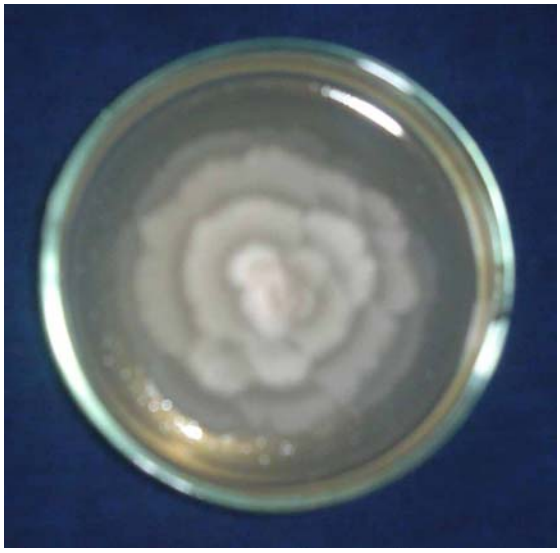
Aspergillus niger





Sporotrichum

Trichoderma



Mortierella

Trichothecium

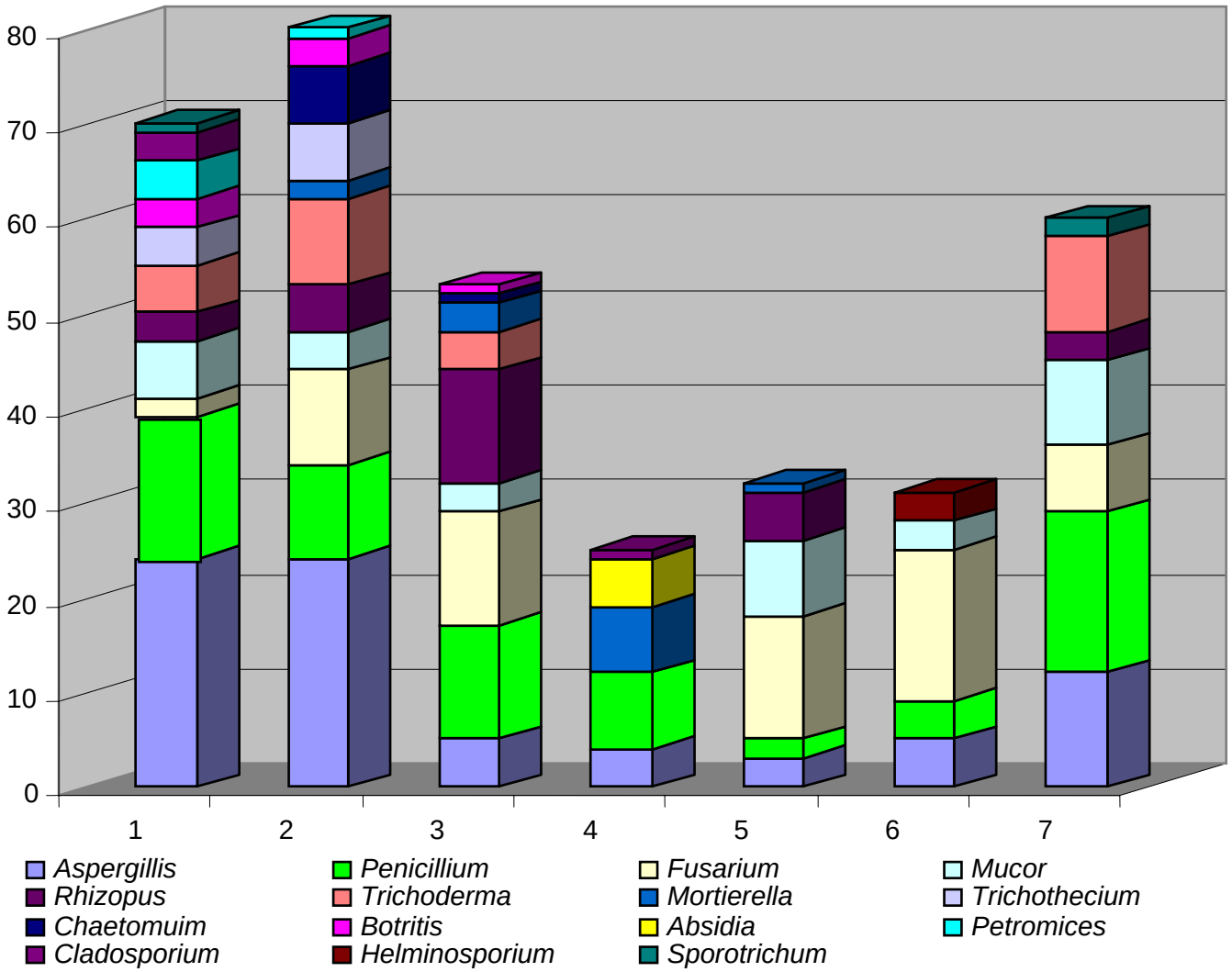
სურათი 2.

1-ელ ცხრილში და მე-3 ნახაზზე კი, ნაჩვენებია გვარების შეხვედრის სიხშირე სხვადასხვა კლიმატურ ზონაში:

ცხრილი 1.

კავკასიის სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივ ზონებში გამოვლენილი მიკროსკოპული სოკოების შეხვედრის სიხშირე გვარების მიხედვით

		Ascomycetes				*Deiteromycetes*							*Zygomicetes*				
№		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
№	კლიმატური ზონები	***Aspergillis***	***Penicillium***	***Chaetomuim***	***Petromices***	***Fusarium***	***Trichoderma***	***Trichothecium***	***Sporotrichum***	***Helminosporium***	***Botritis***	***Cladosporium***	***Mucor***	***Rhizopus***	***Mortierella***	***Absidia***	სულ
1	mSrali subtropikuli zona	24	15		4	2	5	4	1		3	3	6	3			70
2	stepis zona	24	10	6	1	10	9	6			3		4	5	2		80
3	teniani subtropikuli zona	5	12	1		12	4				1		3	12	3		53
4	subalpuri zona	4	8									1			7	5	25
5	alpuri zona	3	2			13							8	5	1		32
6	naxevrad udabnos zona	5	4			16				3			3				31
7	kontinenturi zona	12	17			7	10		2				9	3			60
	mikroskopuli sokoebis raodenoba gvaris mixedviT	77	68	7	5	60	28	10	3	3	7	4	33	28	13	5	351



ნახაზი 3

კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებში დადგენილია დომინანტური გვარები. კვლევების შედეგად მიღებული მონაცემები დაემთხვა ლიტ. მონაცემებს (279), კერძოდ, მიკროსკოპულ სოკოებს შორის *Aspergillus, Penicillium* *დაFFusarium* - ის გვარები ყველაზე ფართოდაა გავრცელებული. შემდეგ მოდის *Mucor* *და* *Trichoderma*-ს გვარები. დანარჩენი გვარები შედარებით მცირე რაოდენობითაა წარმოდგენილი. აღსანიშნავია რომ, 1-2 ადგილზე მყოფი გვარები ყველა ნიადაგობრივ-კლიმატურ ზონაშია გავრცელებული, რაც შეეხება *Fusarium*-ის გვარს მხოლოდ სუბალპურ ზონაში არ არის. მაშინ როდესაც გვარი *Absidia* მხოლოდ აღნიშნულ რეგიონშია გავრცელებული. დადგენილია მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა გვარების გავრცელების კანონზომიერება, რაც განპირობებულია გარემოს ეკოლოგიური და გეოგრაფიული ფაქტორებით, და თავად სოკოების ფიზიოლოგიური თავისებურებებით. კერძოდ, *Aspergillus*-ები უფრო დიდი

რაოდენობითაა წარმოდგენილი წაბლა და შავმიწა ნიადაგებში, ტყის ყომრალ ნიადაგებში სჭარბობს *Penicillium*-ები და ა. შ.

3.3 α- და გლუკო-ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების შერჩევა (სიღრმული კულტივირებით)

კარბოჰიდროლაზების: α- და გლუკო-ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტების შერჩევის მიზნით, კავკასიის სხვადასხვა ეკოლოგიური ნიშებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს შორის, ვაწარმოეთ სკრინინგი სიღრმული კულტივირების პირობებში.

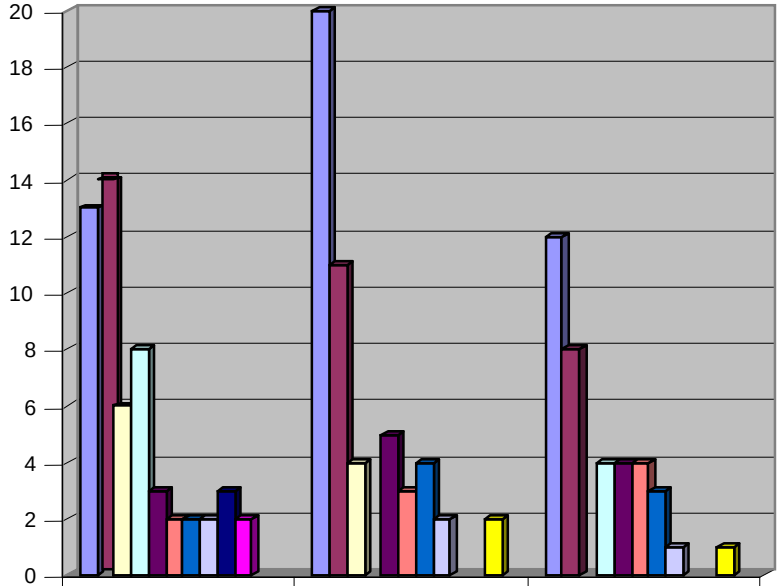
ნახშირბადის წყაროდ აღებული იყო ისეთი სუბსტრატები, რომლებიც საძიებელი ფერმენტების ინდუცირებადი უნარით ხასიათდება. მაგალითად, ამილაზების პროდუცენტების შესარჩევად, ნახშირბადის წყაროდ, ვიყენებდით სახამებელს, ცელულაზების _ მიკროკრისტალურ ცელულოზას. საბოლოოდ გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების სხვადასხვა გვარებიდან შერჩეულ იქნა α-ამილაზას - 37, გლუკოამილაზას - 51, ცელულაზას - 55 პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკო. პროდუცენტები გვარების მიხედვით წარმოდგენილია მე-2 ცხრილში და მე-4 ნახაზზე:

ცხრილი 2

ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოები

№	ცელულაზას პროდუცენტები	Gგლუკო 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. S79’
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. S75
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. S75	
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		



	1	2	3
Aspergillis	13	20	12
Penicillium	14	11	8
Chaetomium	6	4	
Fusarium	8		4
Rizhopus	3	5	4
Mucor	2	3	4
Trichoderma	2	4	3
Cladosporium	2	2	1
Absidia	3		
Sp. pulverulentum	2		
Mortierella		2	1

ნახაზი 4

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

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

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***-ის და ***Penicillium***-ის გვარები.

უნდა ავღნიშნით ისიც, რომ ზოგიერთი კულტურა (20 კულტურა) ორი ან მეტი ფერმენტის პროდუცირების უნარს ავლენს შესაბამისი ინდუქტორის თანაობისას, რაც წარმოდგენილია მე-3 ცხრილში. ამრიგად, ჩვენს მიერ გამოყოფილ მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს შორის 87 შტამი (24%) საკვლევი ფერმენტის პროდუცენტია.

ცხრილი 3

მიკროსკოპული სოკოები, რომლებიც რამდენიმე ფერმენტის სინთეზის უნარით ხასიათდებიან

№	№	ცელულაზის პროდუცენტები	Gგლუკო-ამილაზის პროდუცენტები	ა-ამილაზის პროდუცენტები
1	1	***Aspergillus* sp. S71**	***Aspergillis* sp. S71**	***Aspergillis* sp. S71**
2	2	***Aspergillus* sp. T10**	***Aspergillis* sp. T10**	***Aspergillis* sp. T10**
3	3	***Aspergillis* sp. S51**	***Aspergillis* sp. S51**	
4	4	***Aspergillus* sp. T2**	***Aspergillis* sp. T2**	
5	5	***A. niger* S60**	***A. niger* S60**	
6	6	***A. versicolor* S83**		***A. versicolor* S83**
7	7		***Aspergillis* sp. S53**	***Aspergillis* sp. S53**
8	1	***Trichoderma* sp. P10**	***Trichoderma* sp. P10**	***Trichoderma* sp. P10**
9	2		***Trichoderma* sp. S75**	***Trichoderma* sp. S75**
10	1	***Penicillium* sp S80**	***Penicillium* sp. S80**	***Penicillium* sp. S80**
11	2	***Penicillium* sp T21**	***Penicillium* sp. T21**	***Penicillium* sp. T21**
12	3	***Penicillium* sp T25**	***Penicillium* sp. T25**	***Penicillium* sp. T25**
13	4		***Penicillium* sp. T57**	***Penicillium* sp. T57**
14	5	***Penicillium* sp S35**	***Penicillium* sp. S35**	
15	6	***Penicillium* sp K17**	***Penicillium* sp. K17**	
16	1	***Cladosporium* sp. T48**	***Cladosporium* sp. T48**	***Cladosporium* sp. T48**
17	1	***Fusarium* sp. R20**		***Fusarium* sp. R20**
18	1		***Rhizopus* sp. S33**	***Rhizopus* sp. T33**
19	2	***Rizhopus* sp. R22**	***Rhizopus* sp. R22**	
20	3	***Rizhopus* sp. P39**	***Rhizopus* sp. P39**	

3.4 ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა

დავადგინეთ, შექმნილ კოლექციაში არსებულ 351 მიკროსკოპულ სოკოს შორის არა მარტო ფერმენტების პროდუცენტების ექსტრემოფილობის ხარისხი, არამედ დანარჩენი კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხიც. და ჩატარებული კვლევების

საფუძველზე შევქმენით ექსტრემოფილური (თერმო-, აციდო-, ალკალი- და ჰალოფილური) მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია.

მიკროსკოპული სოკოების ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ მშრალი, სუბტროპიკული კლიმატური ზონიდან (თელავის რაიონი) და სტეპების ზონიდან (სიღნაღის რაიონი) გამოყოფილ მიკროსკოპულ სიკოებში, სადაც ძირითადად შავმიწა, ყავისფერი და წაბლა ნიადაგებია, შეინიშნება თერმოფილური და თერმოტოლერანტული კულტურების სიჭარბე (50-55%), ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ *Aspergilus*-ის გვარის სოკოების (რომლებიც ყველაზე დიდი რაოდენობით გამოვლინდნენ) 25-30% თერმოფილებს წარმოადგენენ, *Chaetomium*-ის გვარის სოკოების 50% თერმოფილია, *Trichoderma*-ს გვარიდან გამოვლენილი 10 კულტურიდან 6 თერმოფილი აღმოჩნდა. ფსიქროტოლერანტობას ავლენდნენ *Fusarium*-ის, *Rizopus*-ის და *Mortierella*-ს გვარის წარმომადგენლები. *Penicillium*-ის *Mucor*-ისა და *Cladosporium*-ის გვარის სოკოებიც დაბალი ტემპერატურის მიმართ ავლენენ ტოლერანტობას, თუმცა ამ გვარის წარმომადგენლებს შორის გამოვლინდა თერმოფილური კულტურებიც.

ალპურ ზონაში - რაჭის რეგიონი (ნეშომპალა-კარბონატული ნიადაგები), *Aspergilus*-ის გვარის ერთი სოკო გამოვლინდა, რომელიც თერმოფილია. ამ ზონაში ძირითად ჭარბობენ ფსიქროტოლერანტები და ფსიქროფილური სოკოები, რომლებიც ძირითადად *Fusarium*-ის გვარიდან არიან, ფსიქროფილებს შორის არიან *Mucor*-ის, *Rizopus*-ის და *Penicillium*-ის გვარის წარმომადგენლები.

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოების კულტურების სპორები სიცოცხლისუნარიანობას დაბალ ტემპერატურაზეც ინარჩუნებენ (106, 219, 247). მსგავსი მოვლენასთან გვქონდა საქმე სუბალპური ზონის - ყაზბეგის რაიონის (მთა-მდელოთა ნიადაგები) შესწავლისას. საქართველოს სუბალპური კლიმატური ზონისათვის დამახასიათებელია ტემპერატურის მაღალი დღეღამური მერყეობა: მცხუნვარე მზიან დღეს, ხშირად საკმაოდ ცივი ღამე ცვლის. ამ რეგიონიდან გამოყოფილი სოკოების უმრავლესობა ფსიქროფილები და ფსოქროტოლერანტები არიან, თუმცა გამოვლენილია რამდენიმე თერმოფილური კულტურა *Absidias*-ს და *Aspergilus*-ის გვარიდან. ფსიქროტოლერანტები *Mucor*-ისა და *Mortierella*-ს გვარის წარმომადგენლებში აღმოჩნდნენ.

ტენიან სუბტროპიკულ ზონიდან (ფოთის რაიონი) გამოვლინდა *Chaetomium*-ის გვარის მიკროსკოპული სოკოს ერთი თერმოფილური კულტურა. თერმოტოლერანტულია ორი კულტურა *Trichoderma*-ს გვარიდან.

ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს: თერმოფილურ მოკროსკოპულ სოკოებში ძირითადად გამოვლენილია *Chaetomium*-ის, *Trichoderma*-ს და *Aspergilus*-ის გვარის სოკოები (76, 110, 191, 260). ფსიქროფილები კი აღმოჩნდნენ *Mucor*-ის, *Mortierella*-ს *Fusarium*-ის და *Penicillium*-ის გვარების წარმომადგენლები (2, 132).

მიკროსკოპული სოკოების ზრდა-განვითარებაზე, წყალბადიონთა კონცენტრაციის გავლენის შეწავლისას აღმოჩნდა, რომ მშრალი სუბტროპიკული კლიმატური ზონის (თელავის რეგიონი) - ყავისფერი, შავმიწა და ალვიური ნიადაგებიდან გამოვლენილი მიკროსკოპული სოკოების 35% კარგად იზრდებოდა pH 9.0-ის პირობებში, სოკოების გარკვეული ნაწილი (28%) კი, ტოლერანტობას ავლენდა pH-ის ფართო დიაპაზონში, სტეპის ზონაში (სიღნაღის რეგიონი), სადაც შავმიწა და წაბლა ნიადაგებია, ალკალიფილური სოკოები შედარებით ნაკლები სიხშირით გამოვლინდნენ. კონტინენტური კლიმატური ზონა (ბორჯომის რაიონი), ცნობილია მინერალური წყლებით. აქ ტყის ყომრალი და გაეწერებული ნიადაგები ჭარბობს და ვულკანური ქანებია. ამ ზონიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის გამოვლინდნენ აციდოფილური კულტურები. წაბლა, დამლაშებული ბიცობიანი ნიადაგებიდან (მარნეულის რაიონი) გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის კი, ალკალიფილური კულტურების სიჭარბე შეინიშნებოდა. ალპურ ზონაში (რაჭის რეგიონი) ნიმუშები აღებული გვქონდა ნეშომპალა-კარბონატული ნიადაგებიდან, ამ ნიადაგებიდან გამოყოფილ კულტურებში ალკალიფილები გამოვლინდნენ *Fusarium*-ის გვარის წარმომადგენლებში, ამავე გვარის სოკოებში ნაკლები სიხშირით გამოვლინდნენ აციდოფილები. pH ტოლერანტული კულტურებიც გვხვდებიდა *Fusarium*-ის გვარის მიკროსკოპულ სოკოებს შორის, (აღსანიშნავია ისიც, რომ როდესაც არეში მატულობდა წყალბადიონთა კონცენტრაცია, *Fusarium*-ის გვარის კოლონიებში შეინიშნებოდა მკვეთრი პიგმენტაცია. ტემპერატურული საზღვრების დადგენისას ამ გვარის წარმომადგენლები ფსიქრო-ტოლერანტულობას ავლენდნენ, ამიტომ pH-ის დიაპაზონის კვლევისას ამ კულტურების კულტივირებას

ვაწარმოებდით 20^{0}C ტემპერატურის პირობებში). სუბალპურ ზონაში (ყაზბეგის რაიონი) შეგვხვდნენ ალკალიფილური კულტურები, გამოვლენილი არიან ასევე pH ტოლერანტები. ტენიან სუბტროპიკულ ზონიდან (ფოთის რაიონი) გამოვლინდა ერთი აციდოფილური კულტურა, რამდენიმე ალკალიფილი და კულტურები, რომლებიც იზრდებოდნენ pH-ის ფართო დიაპაზონში.

ჰალოფილური კულტურები ყველაზე დიდი სიჭარბით გამოვლინდნენ ნახევრადუდაბნოს ზონაში - დამლაშებული ბიცობიანი ნიადაგებიდან (მარნეულის რაიონი). ჰალოფილური და ჰალოტოლერანტული მიროსკოპული სოკოები ასევე გამოვლინდნენ სტეპის ზონაში (სიღნაღის რაიონი), შავმიწა და წაბლა ნიადაგებიდან. ნაკლები სიხშირით გამოვლინდნენ მშრალი სუბტროპიკულ კლიმატურ ზონაში (თელავის რაიონი) - ყავისფერი, შავმიწა და ალვიური ნიადაგებიდან. მარილის მაღალი კონცენტრაციისადმი რეზისტენტული მიკროსკოპული სოკოები მიეკუთვნებიან *Aspergillus*-ის გვარს, არიან *Penicillium*-ის და *Cladosporium*-ის გვარის სოკოებიც. უნდა ავღნიშნოთ ის ფაქტიც, რომ ჰალოფილური კულტურების უმრავლესობა ალკალიფილები არიან, ზოგიერთი კი თერმოფილიც, რაც ლიტერატურულ მონაცემებს ემთხვევა (ჰალოფილური მიკროორგანიზმები ხასიათდებიან ექსტრემოფილობით რამდენიმე ნიშნის მიხედვით) (95, 115, 143, 175, 220).

სუბალპური ზონიდან გამოყოფილი კულტურა, რომელიც *Absidia*-ს გვარითაა იდენტიფიცირებული, არის ექსტრემალური ჰალოფილური სოკოს კლასიკური წარმომადგენელი, რომელსაც შეუძლია სიცოცხლისუნარიანობა შეინარჩუნოს სხვადასხვა კრიტიკულ პირობაში მოხვედრისას. ეს კულტურა ალკალიფილურობით ხასიათდება და თერმოტოლერანტულობასაც ავლენს, სუბალპური ზონის ბუნებრივი კლიმატური პირობების გათვალისწინებით კი, სავარაუდოდ ამ მიკროსკოპული სოკოს სპორებს უნარი აქვს სიცოცხლისუნარიანობა შეინარჩუნოს მკვეთრად დაბალი ტემპერატურის პირობებშიც.

ალპურ ზონის ნეშომპალა-კარბონატული ნიადაგებიდან ირი კულტურაა *Penicillium*-ის გვარის, ორი კულტურა ჰალოფილური აღმოჩნდა.

ჩატარებული კვლევების საფუძველზე შექმნილი ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია 234 კულტურას მოიცავს. ამ კოლექციაში არის

როგორც ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპილი სოკოები, ასევე ისეთი კულტურები, რომელებიც აღნიშნული ფერმენტების მეტაბოლიზმის უნარს არ ავლენენ. მაგრამ სავარაუდოა, რომ ეს შტამები გამოიჩენენ თავს სხვა მეტაბოლიტების დაგროვებისას ან რომელიმე ტიპის კონვერსიის განხორციელების პროცესში.

მე-4 ცხრილში ნაჩვენებია იმ ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების რაოდენობა, რომლებიც საძიებელი კარბოჰიდრაზების პროდუცენტებს არ წარმოადგენენ.

ცხრილი 4

მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილური კულტურები

mikroskopuli sokoebi	Termo filebi	fsiqro filebi	alkali filebi	acido filebi	halo filebi	kulturebis saerTo raodenoba
sxvadasxva zonebidan gamoyofili kulturebi	43	22	63(6)	15	4(12)	147

მოკროსკოპული სოკოების კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენით მიღებული შედეგები წარმოდგენილია მე-5, მე-6 და მე-7 ცხრილებში, სადაც ნაჩვენებია ამილაზებისა და ცელულაზების ყველა პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოს ზრდა-განვითარების ოპტიმალური პირობები.

α-ამილაზის პროდუცენტი მიცელიალური სოკოების განვითარება სხვადასხვა პირობებში
და მათი ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა

№	კულტურა	კულტურის ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონი	ოპტიმ. t°C	კულტურის დახასიათება	ზრდის pH-დიაპაზონი	ოპტ. pH	კულტურის დახასიათება	NaCl-ის კონცენტრაციები	NaCl-ის ოპტ. კონცენტრაცია
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	*Aspergillis* sp. S53	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-1 M	0.5 M
2	*Aspergillis* sp. S54	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-1 M	0.5 M
3	*A .niger* S83	-----	-----	-------	pH 2.0-10.0	pH 6.0-6.5		0.5M-1 M	0.5 M
4	*Aspergillis* sp. S63	10^0-40^0C	30^0-35^0C	მეზოფილი	pH 5.0-10.0	pH 9.5	ალკალიფილი	1M-4 M	3 M
5	*Aspergillis* sp. S71	10^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2 M	1.5 M
6	*Aspergillis* sp. T10	15^0-50^0C	40^0-45^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2.5M
7	*Aspergillis* sp. R5	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1M
8	*Aspergillis* sp. S54’	20^0-50^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.5-8.0	pH 6.5		1M-4 M	3M
9	*A. niger* S16	10^0-35^0C	25^0-30^0C	მეზოფილი	pH 3.5-8.0	pH 6.5		0.5M-3 M	2.5M
10	*A. niger* B47	-----	-----	მეზოფილი	pH 2.0-6.5	pH 2.5	აციდოფილი	0.5M--3 M	1.5M
11	*A. niger* B80	-----	-----	მეზოფილი	pH 4.0-8.0	pH 5.5-6.0		0.5M-3 M	2.5M
12	*A. oryzae* S27	-----	-----	მეზოფილი	pH 4.0-8.0	pH 5.5-6.0		0.5M-3 M	2.5M
13	*Fusarium* sp. S56	10^0-40^0C	30^0-35^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 6.0-6.5		0.5M-1 M	0.5M
14	*Fusarium* sp. R16	15^0-40^0C	30^0-35^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 6.0-6.5		0.5M-1 M	0.5M
15	*Fusarium* sp. R20	10^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 6.0-6.5		0.5M-1 M	1M
16	*Fusarium* sp. S27	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 6.0-6.5		0.5M-2 M	1.5M
17	*Fusarium* sp. R29	5^0-35^0C	25^0-30^0C	ფსიქროტოლერანტი	pH 2.0-9.0	pH 6.0-6.5		0.5M-1 M	1M
18	*Rhizopus* sp. S79	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.5	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
19	*Rhizopus* sp. S76	-----	-----	-------	pH 4.0-10.0	pH9.5	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2.5M
20	*Rhizopus* sp. T33	15^0-55^0C	45^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.0-10.0	pH 9.5	ალკალიფილი	0.5M-3 M	1.5M
21	*Trichoderma* sp. S79	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.5-8.5	pH 5.5-6.0		0.5M-2.5M	1.5M
22	*Trichoderma* sp. P10	-----	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-1 M	1M
23	*Trichoderma* sp. S75	-----	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-1 M	1M

24	*Penicillium* sp. S80	10^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2.5M
25	*Penicillium* sp. T21	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2M
26	*Penicillium* sp. T25	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-8.0	pH 6.5		0.5M-3 M	2M
27	*Penicillium* sp. T26	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-8.0	pH 6.5		0.5M-3 M	2M
28	*Penicillium* sp. R15	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-8.0	pH 6.5	მეზოფილი	1M-4 M	3M
29	*Penicillium* sp. S46	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-8.0	pH 6.5		0.5M-2.5M	1.5M
30	*Penicillium* sp. T52	5^0-25^0C	20^0-25^0C	ფსიქროფილი	pH 4.0-8.0	pH 6.5		1M-4 M	3M
31	*Penicillium* sp. T57	10^0-50^0C	45^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2.5M
32	*Mucor* sp. T37	5^0-40^0C	30^0C	ფსიქროტოლერანტი	pH 3.0-7.5	pH 6.0		0.5M-1 M	0.5 M
33	*Mucor* sp. R33	5^0-40^0C	30^0C	ფსიქროტოლერანტი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-1 M	0.5 M
34	*Mucor* sp. K22	20^0-50^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.0-7.5	pH 6.5		0.5M-2.5M	1.5M
35	*Mucor* sp. T18	20^0-50^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.0-7.5	pH 6.5		0.5M-2.5M	1.5M
36	*Cladosporium* sp. T48	20^0-50^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2.5M
37	*Mortierella* sp. S34	5^0-30^0C	25^0C	ფსიქროფილი	pH 4.0-8.0	pH 5.5-6.0		0.5M-1 M	0.5 M

ცხრილი 6

გლუკო ამილაზის პროდუცენტი მიცელიალური სოკოების განვითარება სხვადასხვა პირობებში და მათი ექსტრემოფილობის ხარისხი

№	კულტურა	კულტურის ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონი	ოპტიმ. t°C	კულტურის დახასიათება	ზრდის pH-დიაპაზონი	ოპტ. pH	კულტურის დახასიათება	NaCl-ის კონცენტრაციები	NaCl-ოპტ. კონცენტრაც
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	*Aspergillis* sp. S51	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 2.0-5.0	pH 2.5	აციდოფილი	0.5M-2.5M	1.5M
2	*Aspergillis* sp. S52	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 3.0-8.0	pH 6.0		0.5M-2.5M	1.5M
3	*Aspergillis* sp. S53	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2.5M	1.5M
4	*Aspergillis* sp. S58	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.0-8.0	pH 6.0		0.5M-3 M	2.5M
5	*Aspergillus* sp. S 60	10^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 3.0-8.0	pH 6.0		0.5M-3 M	2.5M

6	*A. niger* S64	10^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.0-11.0	pH 9.5	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2 M
7	*A. niger* S65	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 2.0-6.5	pH 2.5	აციდოფილი	0.5M-2 M	1.5M
8	*Aspergillis* sp. S71	10^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 2.0-10.0	pH 5.5		0.5M-2 M	1.5M
9	*Aspergillis* sp. S73	10^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1M
10	*Aspergillis* sp. T2	15^0-45^0C	35^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.5	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
11	*Aspergillis* sp. T10	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2.5M
12	*Aspergillis* sp. T31	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.5	ალკალიფილი	1M-4 M	3M
13	*Aspergillis* sp. S2	25^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 2.0-9.5	pH 6.5		0.5M-2 M	1M
14	*Aspergillis* sp. K2	25^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 2.0-10.0	pH 6.0-6.5		0.5M-2 M	1M
15	*Aspergillis* sp. K4	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.5-10.0	pH 6.5-7.0		0.5M-2 M	1M
16	*A. awamori* S11	20^0-40^0C	35^0C	მეზოფილი	pH 3.5-8.5	pH 6.5		0.5M	-
17	*A. awamori* T23	20^0-40^0C	35^0C	მეზოფილი	pH 3.5-8.5	pH 6.0-6.5		0.5M	-
18	*A .niger* 68B	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.0-8.5	pH 6.0		0.5M	-
19	*A niger* 75B	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.0-8.5	pH 5.5-6.0		1M-3M	2M
20	*Aspergillis* sp. S51[1]	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.5-9.0	pH 6.5		0.5M-2 M	1.5M
21	*Penicillium* sp. P5	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.0-8.5	pH 5.5-6.0		0.5M-2 M	1.5M
22	*Penicillium* sp. S48	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 1.5-6.5	pH 2.0	აციდოფილი	0.5M-2 M	1M
23	*Penicillium* sp. S80	10^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2M
24	*Penicillium* sp. T21	10^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2 M
25	*Penicillium* sp. T25	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-8.0	pH 6.5		0.5M-2 M	1.5M
26	*Penicillium* sp. S32	5^0-30^0C	25^0-30^0C	ფსიქროფილი	pH 3.0-8.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
27	*Penicillium* sp. S35	5^0-30^0C	25^0C	ფსიქროფილი	pH 3.0-8.0	pH 5.5-6.0		1M-4 M	3M
28	*Penicillium* sp. S46	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.0-8.0	pH 6.5		0.5M-2 M	1.5M
29	*Penicillium* sp. T57	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2.5M
30	*Penicillium* sp. K17	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
31	*Penicillium* sp. K28	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.5-8.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
32	*Mucor* sp. S57	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-3 M	1.5M
33	*Mucor* sp. K32	5^0-25^0C	20^0C	ფსიქროფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-2 M	1.5M
34	*Mucor* sp. K55	5^0-30^0C	25^0C	ფსიქროფილი	pH 4.5-8.5	pH 6.5		1M-2 M	1M
35	*Chaetomium* sp. S67	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-2 M	1M

36	*Chaetomium* sp. S77	20^0-70^0C	45^0C	თერმოფილი	pH.45-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-2 M	1M
37	*Chaetomium* sp. P36	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
38	*Chaetomium* sp. S'48	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.5-8.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
39	*Cladosporium* sp. T38	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
40	*Cladosporium* sp. T48	20^0-50^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-4 M	2.5M
41	*Rhizopus* sp. R1	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-8.5	pH 6.5		0.5M-2 M	1.5M
42	*Rhizopus* sp. R22	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-8.5	pH 6.5		0.5M-2 M	1.5M
43	*Rhizopus* sp. S33	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-8.5	pH 6.5		0.5M-3 M	1.5M
44	*Rhizopus* sp. S13	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-8.5	pH 6.5		0.5M-2 M	1.5M
45	*Rhizopus* sp. P39	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-8.5	pH 6.5		1M-2 M	1M
46	*Trichoderma* sp. S57'	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 2.0-6.5	pH 2.0	აციდოფილი	1M-2 M	1M
47	*Trichoderma* sp. P7	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 3.0-80.0	pH 6.0		1M-3M	2M
48	*Trichoderma* sp. P10	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-3 M	2M
49	*Trichoderma* sp. S75	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-3 M	2M
50	*Mortierella* sp. K64	5^0-30^0C	25^0C	ფსიქროფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.5	ალკალიფილი	1M-2 M	1M
51	*Mortierella* sp. K33	5^0-30^0C	25^0C	ფსიქროფილი	pH 4.0-8.5	pH 6.5		0.5M	-

ცხრილი 7

ცელულაზის პროდუცენტი მიცელიალური სოკოების განვითარება სხვადასხვა პირობებში და მათი ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა

№	კულტურა	კულტურის ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონი	ოპტიმ. t°C	კულტურის დახასიათება	ზრდის pH-დიაპაზონი	ოპტ. pH	კულტურის დახასიათება	NaCl-ის კონცენტრაციები	NaCl-ოპტ. კონცენ. ტრაც
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1	*Aspergillis* sp. S51	15^0-45^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 2.0-5.0	pH 2.5	აციდოფილი	0.5M-2.5M	1.5M
2	*Aspergillus* sp. S 60	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 3.0-8.0	pH 6.0		0.5M-3 M	2.5M
3	*Aspergillus* sp. S71	10^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 2.0-10.0	pH 5.5		0.5M-2 M	1.5 M
4	*Aspergillus* sp. T2	15^0-45^0C	35^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
5	*Aspergillus* sp. T5	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2 M
6	*Aspergillus* sp. T6	25^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2 M
7	*Aspergillus* sp. T9	15^0-40^0C	35^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2.5M	1.5M
8	*Aspergillus* sp. T10	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2.5M
9	*Aspergillus* sp. T20	5^0-50^0C	40^0C	-------	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2.5M	1.5M
10	*Aspergillus* sp. T55	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-10.0	pH 6.5		0.5M	-
11	*A. versicolor* S83	20^0-55^0C	40^0C-45^0C	თერმოფილი	pH 4.0-8.0	pH 6.0-65		0.5M	-
12	*A. terreus* T39	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.5-8.5	pH 6.5		0.5M-2.5M	1.5M
13	*A. batatae* B50	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.0-9.0	pH 6.0		0.5M-2.5M	1.5M
14	*Chaetomium* sp. S67	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-2 M	1M
15	*Chaetomium* sp. S77	20^0-50^0C	45^0C	თერმოფილი	pH.45-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-2 M	1M
16	*Chaetomium* sp. S5	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-6.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
17	*Chaetomium* sp. S26	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.5-6.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
18	*Chaetomium* sp. P36	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
19	*Chaetomium* sp. T35	-----	-----	-------	pH 3.5-7.0	pH 6.0		1M-2 M	1M
20	*Trichoderma* sp. S78	15^0-50^0C	40^0C-45^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-2 M	1M
21	*Trichoderma* sp. P10	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-3 M	2M
22	*Penicillium* sp. P11	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.5	pH 6.5-7.0		1M-2 M	1M
23	*Penicillium* sp S80	15^0-40^0C	30^0-35^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2M
24	*Penicillium* sp S84	-----	-----	-------	pH 1.5-6.5	pH 2.0	აციდოფილი	0.5M-2 M	1M
25	*Penicillium* sp T21	-----	-----	-------	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-3 M	2 M
26	*Penicillium* sp T25	-----	-----	-------	pH 4.0-8.0	pH 6.5		0.5M-2 M	1.5M
27	*Penicillium* sp S4	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.5-7.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1M
28	*Penicillium* sp S10	5^0-25^0C	25^0C	ფსიქროფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	3M
29	*Penicillium* sp S29	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 6.5		0.5M-2 M	1M
30	*Penicillium* sp S35	5^0-25^0C	20^0-25^0C	ფსიქროფილი	pH 3.0-8.0	pH 5.5-6.0		1M-4 M	3M

31	*Penicillium* sp S60’	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.0-7.0	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
32	*Penicillium* sp T53	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.0-7.0	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
33	*Penicillium* sp K17	10^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2 M	1.5M
34	*Penicillium* sp K19’	-----	-----		pH 2.0-9.0	pH 6.0-6.5		0.5M-2 M	1.5M
35	*Penicillium* sp K36	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 2.0-9.0	pH 6.0-6.5		0.5M	-
36	*Cladosporium* sp. T27	25^0-50^0C	40^0-45^0C	თერმოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-4 M	2.5M
37	*Cladosporium* sp. T48	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 4.5-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-4 M	2.5M
38	*Fusarium* sp. T30	10^0-40^0C	35^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2.5M	1.5M
39	*Fusarium* sp. R8	5^0-35^0C	25^0C	ფსიქროტოლერანტი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2.5M	1.5M
40	*Fusarium* sp. R20	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2.5M	1.5M
41	*Fusarium* sp. R27	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2 M	1M
42	*Fusarium* sp. R28	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2 M	1M
43	*Fusarium* sp. S10	20^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2 M	1M
44	*Fusarium* sp. S61’	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2 M	1M
45	*Fusarium* sp. P4	-----	-----	-------	pH 2.0-9.0	pH 5.5-6.0		0.5M-2.5M	1.5M
46	*Rizhopus* sp. R22	15^0-40^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 3.0-7.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1.5M
47	*Rizhopus* sp. R26	5^0-40^0C	30^0C	ფსიქროტოლერანტი	pH 3.0-7.5	pH 6.0		0.5M-2 M	1M
48	*Rizhopus* sp. P39	15^0-35^0C	30^0C	მეზოფილი	pH 4.5-11.0	pH 9.5	ალკალიფილი	1M-2 M	1M
49	*Absidia* sp. K61	15^0-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	3M
50	*Absidia* sp. K69	5^0-40^0C	30^0C	ფსიქროტოლერანტი	pH 2.0-6.5	pH 2.5	აციდოფილი	1M-4 M	2M
51	*Absidia* sp. K68	15^0-50^0C	35^0C	მეზოფილი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	1M-4 M	2M
52	*Mucor* sp. K70	5^0-40^0C	30^0C	ფსიქროტოლერანტი	pH 4.0-10.0	pH 9.0	ალკალიფილი	0.5M-2.5M	1.5M
53	*Mucor* sp.T54	15^0C-50^0C	40^0C	თერმოტოლერანტი	pH 4.0-11.0	pH 9.5	ალკალიფილი	0.5M-2.5M	1.5M
54	*Sp. pulverulentum* S7	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.0-8.5	pH 6.0-6.5		0.5M-2.5M	1.5M
55	*Sp. pulverulentum* S43	20^0-55^0C	45^0C	თერმოფილი	pH 3.0-8.5	pH 6.0-6.5		0.5M	-

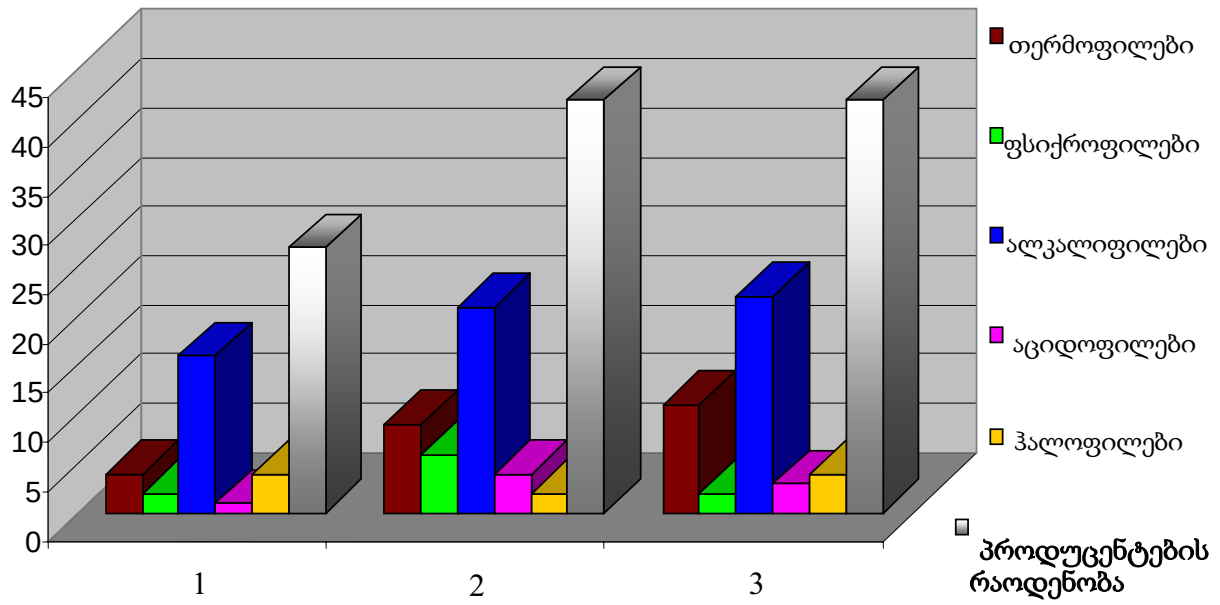
აღნიშნულ ცხრილებში წამოდგენილი მონაცემების საფუძველზე, შევაჯამეთ ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილური კულტურების საერთო რაოდენობა. რაც ნაჩვენებია მე-8 ცხრილსა და მე-5 ნახაზზე.

ცხრილი 8

ამილაზებისა და ცელულაზების პროდუცენტი - ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოები

1		თერმო ფილები	ფსიქრო ფილები	ალკალი ფილები	აციდოფი ლები	ჰალოფ ილები	პროდუცენტები ს რაოდენობა	კულტურების 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 5.

ფერმენტების პროდუცენტი ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოები:

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

3. ცელულაზას პროდუცენტები.

ხოლო მე-9 ცხრილში წარმოდგენილია, გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოს 351 კულტურას შორის, ექსტრემოფილური კულტურების საერთო რაოდენობა.

ცხრილი 9

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 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. ამდენად შექმნილია ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოების კოლექცია.

შემდგომი კვლევისათვის კარბოჰიდრაზების ექსტრემოფილურ პროდუცენტებს შორის, შევარჩიეთ საძიებელი ფერმენტების აქტიური პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები. წარმოდგენილია მე-10 ცხრილში.

ცხრილი 10

კარბოჰიდრაზების 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

3.5 კარბოჰიდრაზების (ამილაზების და ცელულაზების) აქტიური პროდუცენტი ექსტრემოფილური, მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ფიტო და ზოოპათოგენურობის დადგენა

მიკოტოქსიკოლოგიური გამოკვლევების გზით დავადგინეთ, რომ, კარბოჰიდრაზების აქტიური პროდუცენტი, მიკროსკოპული სოკოს, კულტურები არ არიან პათოგენურები და ტოქსიკურები. ეს კი საშუალებას იძლევა მიღებული შტამები გამოყენებულ იქნას სამრეწველო დანიშნულებით. შესაბამისი შემოწმების შემდეგ, ამ კულტურების გამოყენება შესაძლებელია ისეთ დარგებში, როგორიცაა მედიცინა და კვების მრეწველობა.

თავი IV

საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი ექსრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებიდან, კარბოჰიდრაზების – ამილაზების და ცელულაზების აქტიური პროდუცენტებისათვის საკვები არეების ოპტიმიზაცია და კულტივირების პირობების შერჩევა

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

ამილაზების და ცელულაზების სინთეზი შესაძლებელია, საკვებ არეში სუბსტრატის ან სხვა სპეციფიკური ინდუქტორის არსებობის შემთხვევაში (1, 56, 67, 75, 148, 152, 164, 177, 178, 186, 191, 208, 255).

დადგენილია, რომ ამილაზური ფერმენტების ბიოსინთეზის ინდუქტორებს უნდა ჰქონდეთ ა-1,4 და ა-1,6 გლიკოზიდური ბმები (1, 7, 10, 27, 28, 133, 191). უჯრედგარე ცელულაზების ინდუქცია კი ხორციელდება β-1,4 ბმების არსებობისას (1, 10, 76, 186, 260)

4.1 ფერმენტების პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური საკვები არის შერჩევა და კულტივირების ოპტიმალური ხანგრძლივობის დადგენა სიღრმული კულტივირებისას

ამილაზების პროდუცენტებისათვის ნახშირბადის წყაროებად გამოიყენებოდა სახამებელი და ხორბლის ქატო 6%-ის ოდენობით, დისაქარიდები α-1,4 და α-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 α-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.

დავადგინეთ 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 მეზოფილური და ექსტრემოფილური პროდუცენტი კულტურებითვის, საკვები არეების ოპტიმიზაციის შემდეგ, შევარჩიეთ შემდეგი შემადგენლობის არეები:

α-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).

ცხრილი 10

სელექციურად შერჩეული კარბოჰიდრაზების აქტიური პროდუცენტები

#	kultura	kulturebis mier produc. fermentebi	aqtivobebi erT/ml	kulturebis eqstremofiloba
1	*Aspergillus niger* B47	α-ამილაზა	4.5	აციდოფილი
2	*Aspergillus oryzae* B27	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* S83	ცელულაზა	1.2	თერმოფილი
8	*Rizhopus* sp. R22	ცელულაზა	0.75	მეზოფილი

9	*Absidia* sp. K61	ცელულაზა	0.65	თერმოტოლერანტი, ალკალიფილი, ექსტრემალური ჰალოფილი

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.11).

4.2 ფერმენტების პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას

ვინაიდან, მიკროორგანიზმების ზრდისა და ფიზიოლოგიური აქტიურობის გამოვლენისათვის ტემპერატურა ყველაზე მნიშვნელოვანი ფაქტორია, პირველ რიგში შესწავლილ იქნა ტემპერატურის გავლენა ამ თუ იმ კულტურის მიერ პროდუცირებული ფერმენტის აქტიურობაზე.

ფერმენტების აქტიური პროდუცენტების ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურის გათვალისწინებით, მათი სიღრმული კულტივირება შესაბამისად ხდებოდა სხვადასხვა ტემპერატურაზე: თერმოფილების კულტივირება მიმდინარეობდა 30^0C-ის ზევით 55^0C-მდე,

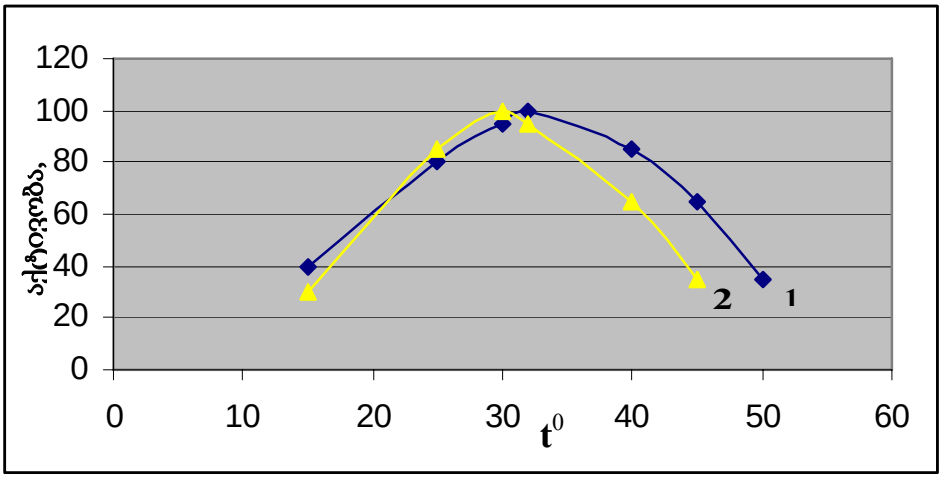
ასევე, მიკროორგანიზმების ფიზიოლოგიურ აქტიურობაზე დიდ გავლენას ახდენს საკვები არის pH. ამ შემთხვევაშიც მხედველობაში მივიღეთ აღნიშნული კულტურების ზრდისათვის ოპტიმალური წყალბადიონთა კონცენტრაცია. მიკროსკოპული სოკოების კულტურების კულტივირებას ვაწარმოებდით სხვადასხვა pH-ის მქონე არეებში: pH 2.0-დან pH 11.0-ის ჩათვლით, 0.5 pH-ის ინტერვალით.

4.2.1 α-ამილაზას პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას

მეზოფილური და ექსტრემოფილური შტამების მიერ პროდუცირებული ფერმენტების მოქმედებების შედარების მიზნით, α-ამილაზას პროდუცენტებს შორის დავადგინეთ აციდოფილური – *Aspergillus niger* B47 და მეზოფილი აქტიური პროდუცენტის *Aspergillus oryzae* B27 კულტივირების პირობები. აღმოჩნდა, რომ

კულტურა – *Aspergillus niger* B47 მაღალ - ა-ამილაზურ აქტივობას ამჟღავნებს 32^{0}C-ზე, ხოლო კულტურა - *Aspergillus oryzae* B27 – 30^{0}C-ზე (ნახაზი 6). ასევე, დავადგინეთ ამ კულტურების ზრდის ოპტიმალური pH, რადგან კულტურა - *Aspergillus niger* B47 – აციდოფილია, სიღრმულ კულტივირებას ვაწარმოებდით არეში, რომლის pH 2.0-დან pH 8.0-მდე იცვლებოდა. კულტურა ყველაზე დიდი რაოდენობით ა-ამილაზას წარმოქმნის pH 3.0-3.7-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. 7).

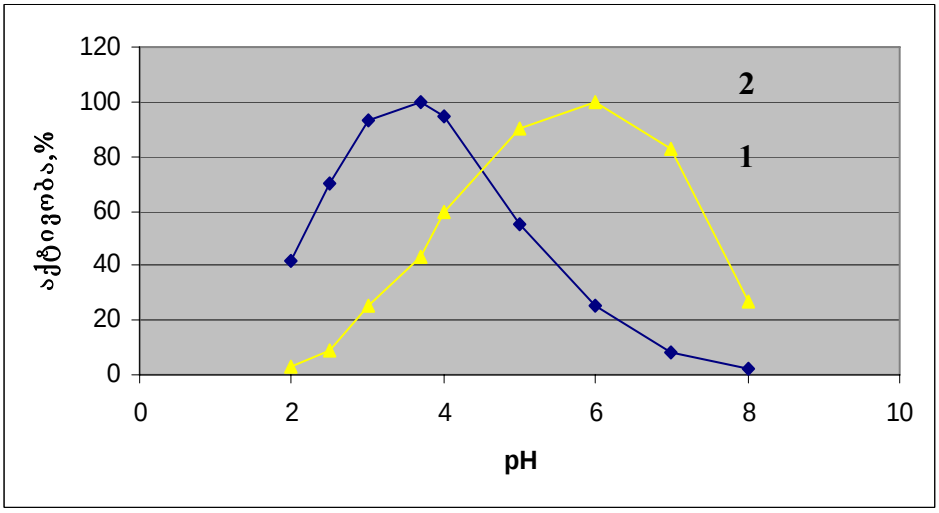
ნახ. 6.
ტემპერატურის გავლენა α-ამილაზას
ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



<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 – 5..0

ნახ. 7.
pH-ის გავლენა α-ამილაზას ბიოსინთეზზე
სიღრმული კულტივირებისას



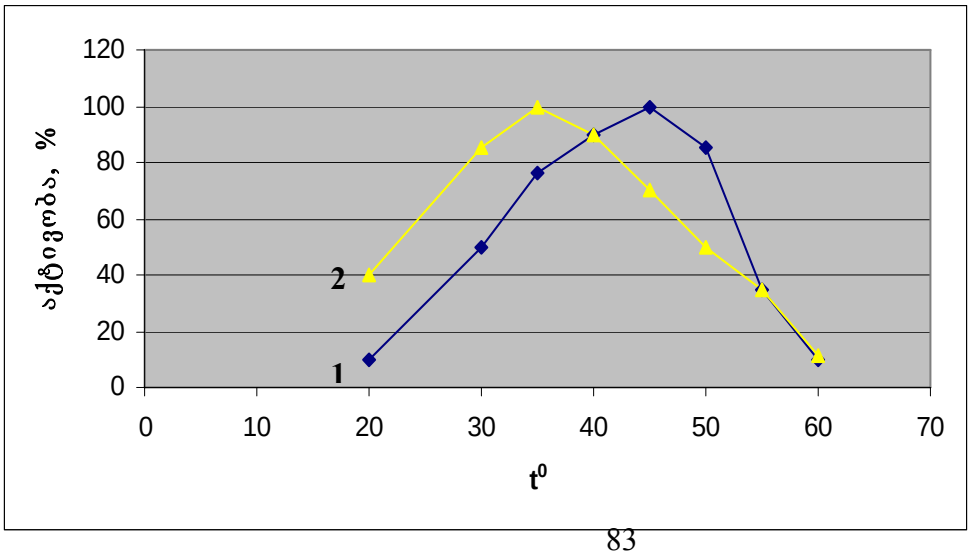
<u>კულტურები:</u> 1. *A. niger* B47; 2. *A. oryzae* B27

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

4.2.2 გლუკოამილაზას პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას

გლუკოამილაზას პროდუცენტებს შორის დავადგინეთ კულტურების - *Cladosporium* T48 (თემოფილი) და *Aspergillus awamori* T23 (მეზოფილი) სიღრმული კულტივირების პირობები. აქედან, პირველი კულტურა საინტერესო იყო იმით, რომ ერთდროულად არის ალკალიფილი და თერმოფილი (ნახ. 8, 9).

ნახ. 8.
ტემპერატურის გავლენა გლუკოამილაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას

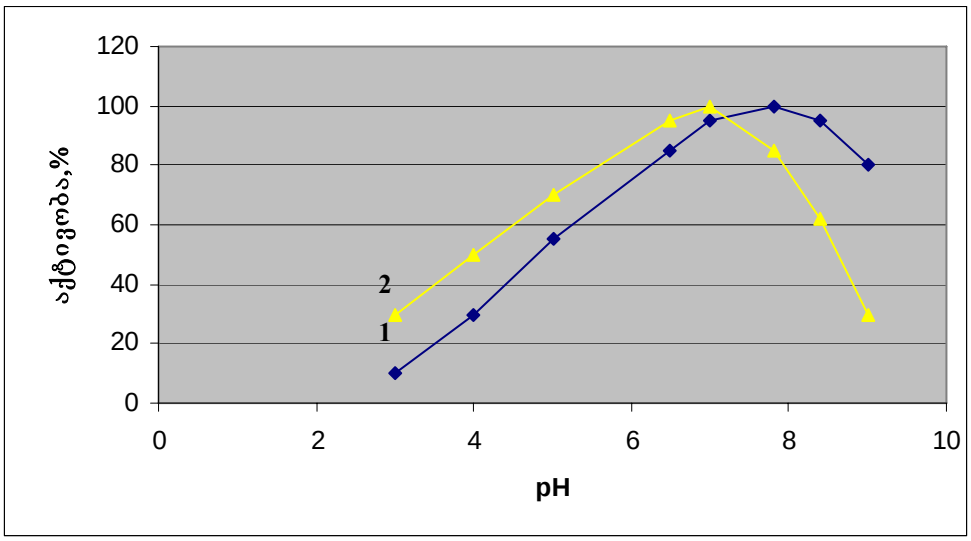


<u>კულტურები:</u>

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;

ნახ. 9
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;

4.2.3 ცელულაზას პროდუცენტი - მიკროსკოპული სოკოებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურის და ოპტიმალური pH-ის შერჩევა სიღრმული კულტივირებისას

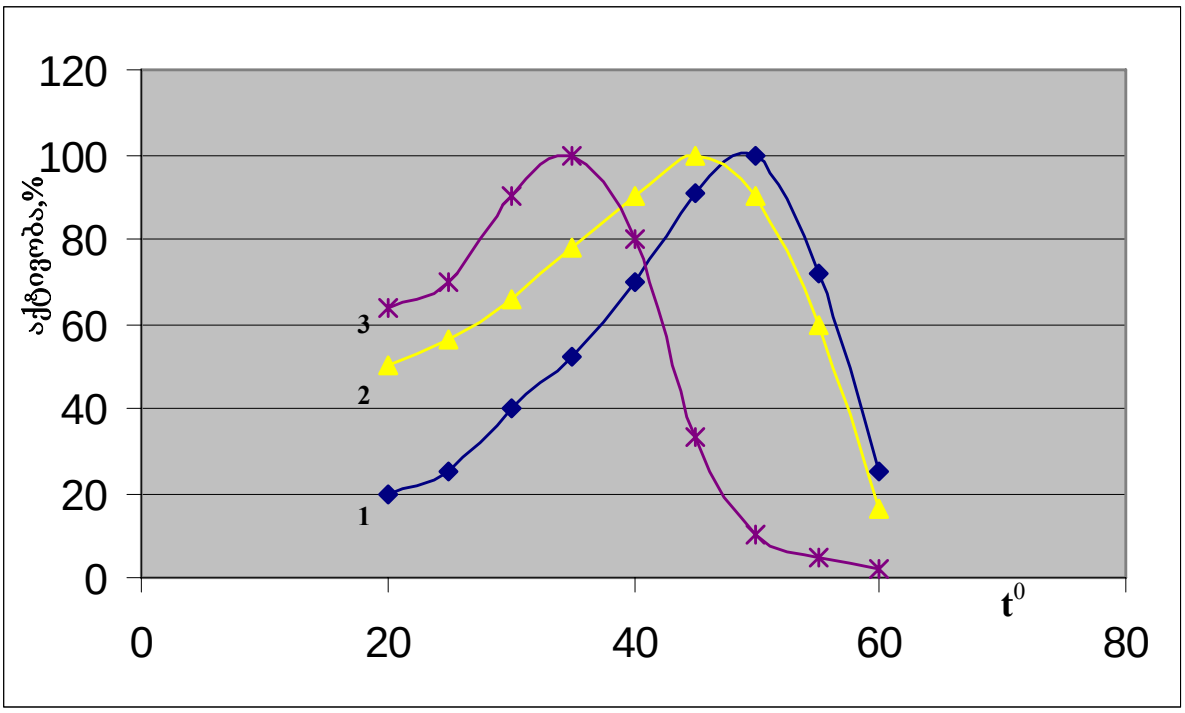
ცელულაზას პროდუცენტებს შორის დადგენილია ყველაზე აქტიური შტამების *Aspergillus versicolor* S83-ის (თერმოფილი). *Absidia* sp. K61-ის (ალკალიფილი და

ჰალოფილი), და მეზოფილური კულტურის *Rizopus* sp. R22-ის კულტივირების პირობები.

თერმოფილი კულტურის *Aspergillus versicolor* S-83-ის სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური ტემპერატურა უდრის 50^{0}C. თერმოტოლერანტი კულტურის *Absidia* sp. K-61-ის სიღრმული კულტივირების ოპტიმალური ტემპერატურა არის 45^{0}C. ამ მონაცემზე დაყრნობით ეს კულტურა შეიძლება ჩაითვალოს თერმოტოლერანტად. კულტურა *Rizopus* sp. R-22 -ის ოპტიმალური ტემპერატურაა 35^{0}C. (ნახ. 10)

ნახ. 10

ტემპერატურის გავლენა ცელულაზას ბიოსინთეზზე სიღრმული კულტივირებისას



<u>კულტურები:</u>

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

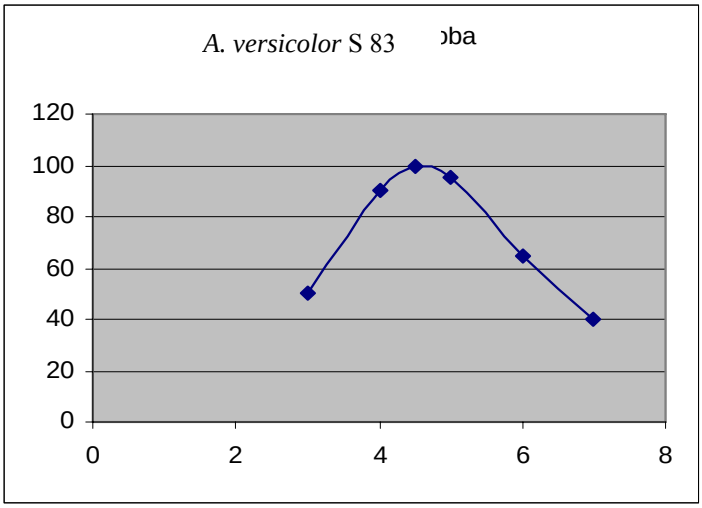
<u>ცდის პირობები:</u>

ტემპერატურა იცვლებიდა 20^0-დან 60^0-მდე, 5^0-ის ინტერვალით;

Aspergillus versicolor S83-ისათვის ოპტიმალური pH 4.5-ია, *Absidia* sp. K61-ის – pH 7.0, *Rizopus* sp. R22-ის – pH 6.0 (ნახ. 11).

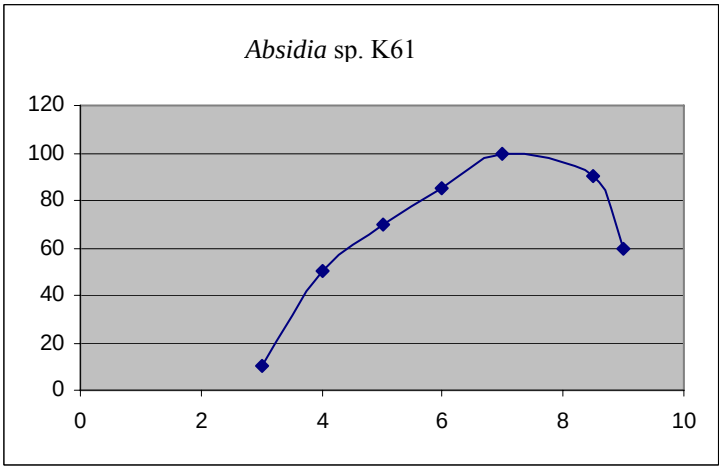
ნახ. 11

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



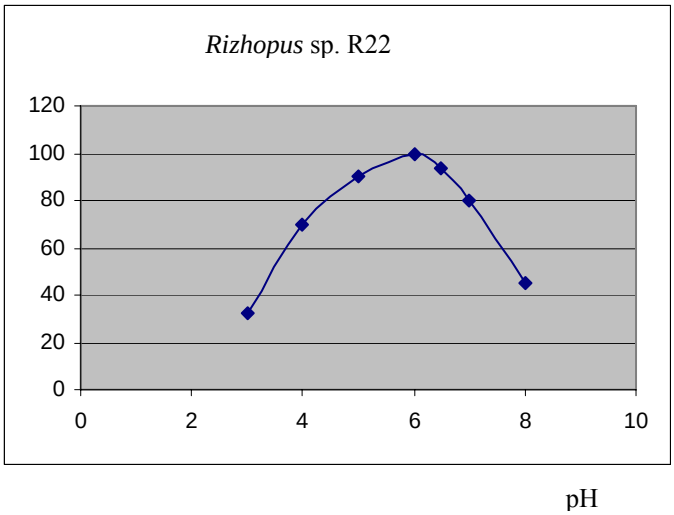
pH

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



pH

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}C; საკვები არის pH-ი იცვლებოდა 3.0-დან – 11-მდე, 0.5 ინტერვალით

აღსანიშნავია, რომ, უმეტეს შემთხვევაში, თერმოფილების ტემპერატურის ოპტიმუმი სიღრმული კულტივირებისას შეადგენს 40-45^{0}C, ხოლო მეზოფილეური კულტურებისათვის _ 30-35^{0}C. მიკროსკოპული სოკოების სიღრმულ კულტივირებაზე pH-ის გავლენის შესწავლამ გვიჩვენა რომ, ალკალიფილების pH ოპტიმუმი pH-7.0-ზე უფრო მეტია, აციდოფილების კი უფრო ხშირად მერყეობს pH 3.0-დან pH 4.5-მდე.

უნდა აღინიშნოს რომ, აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH ხშირად არ შეესაბამება გარემოს წყალბადიონთა კონცენტრაციას. ყველაზე აციდოფილური მიკროორგანიზმების უჯრედშიდა pH-იც კი ხანდახან ოდნავ უახლოვდება დაბალ pH-ს. (pH-5.0), მაშინ როდესაც მათი ზრდის pH ოპტიმუმი არის pH-2.0. (18)

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

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

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

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

კულტივირების პირობების შერჩევისას, ასევე დიდი მნიშვნელობა აქვს სიღრმული კულტივირების ხანგრძლივობის დადგენას და ჩასათესი მასალის ასაკს. მიკრომიცეტებისათვის ოპტიმალურია 72-96სთ (72სთ – ამილაზების (ა-ამილაზის და გლუკოამოლაზის პროდუცენტებისათვის, 96სთ – ცელულაზის პროდუცენტებისათვის). ჩასათესი მასალის ოპტიმალურ ასაკს ამილაზებისათვის წარმოადგენდა 9-დღიანი, ხოლო ცელულაზებისათვის _ 10 დღიანი კულტურის კონიდიების სუსპენზია.

შერჩეული შტამების საკვები არეების ოპტიმიზაციისა და ოპტიმალური პირობების დადგენით გაიზარდა საწყისი აქტივობები (ცხ. 11). 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-ის, *Aspergillus awamori* T23-ის და *Aspergillus niger* M8-ს აქტივობები გაიზარდა 66%, 28% და 10%-ით. ცელულაზას პროდუცენტების - *Aspergillus versicolor* S83, *Absidia* sp. K61-ის აქტივობები გაიზარდა 16% და 15%-ით.

ცხრილი 11

კარბოჰიდრაზების აქტიური პროდუცენტები

№	კულტურა	კულტურების მიერ პროდუც. კარბოჰიდრაზები	საწყისი აქტვიობები ერთ/მლ	აქტივობები, ერთ/მლ ოპტიმალური პირობების შემდეგ	აქტივობები, ერთ/მლ საკვები არეების ოპტიმიზაციის შემდეგ	ფერმენტების გაზრდილი აქტვიობები %-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-	14.5	14.5	16,0	10

		ამილაზა				
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

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.

თავი V

საქართველოს სხვადასხვა კლიმატურ-ნიადაგობრივი ზონებიდან გამოყოფილი ექსტრემოფილური მიკროსკოპული სოკოებიდან, გამოყოფილი ამილაზების და ცელულაზების ფერმენტული პრეპარატების დახასიათება

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

5.1 კარბოჰიდრაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება

საკვლევი ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატის მიღებისას გამოვიყენეთ საერთო სქემა. კერძოდ, აღნიშნული კულტურების სიღრმული კულტივირების შედეგად მიღებულ სითხეს ვფილტრავდით, შემდეგ კულტურალურ სითხეს ვაციებდით (4^0C) 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 მე-12 ცხრილში, 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 12.

მიკროსკოპული სოკოების 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	იზოპროპანოლი	1:1,5	45	1:1	62	1:1	55

5.2 კარბოჰიდრაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმების დადგენა

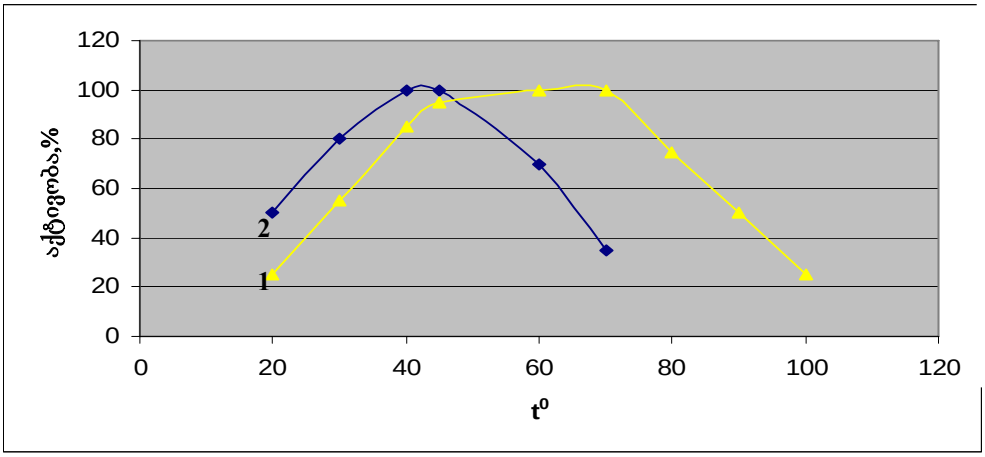
დავადგინეთ მიღებული ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმები. ამისთვის ფერმენტულ პრეპარატების აქტივობებს

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 0,05M აცეტატურ ბუფერში, pH 4.7. ამილაზების შემთხვევაში სუბსტრატი იყო 1%-იანი სახამებლის ხსნარი იგივე ბუფერულ სისტემაში.

α-ამილაზას პროდუცენტებს შორის საკვლევად აღებული იყო თერმოფილური - *Aspergillus niger* S54-ის და მეზოფილური - *Aspergillus oryzae* B27-ის შტამების მიერ პროდუცირებული ფერმენტების ტექნიკური პრეპარატები. თერმოფილური შტამის ა-ამილაზას მაქსიმალური აქტივობა ჰქონდა 70^{0}C-ზე, ხოლო მეზოფილური შტამისას _ 45^{0}C-ზე (ნახ. 12).

ნახაზი 12.

ტემპერატურის გავლენა α-ამილაზას ფერმენტულ აქტივობაზე



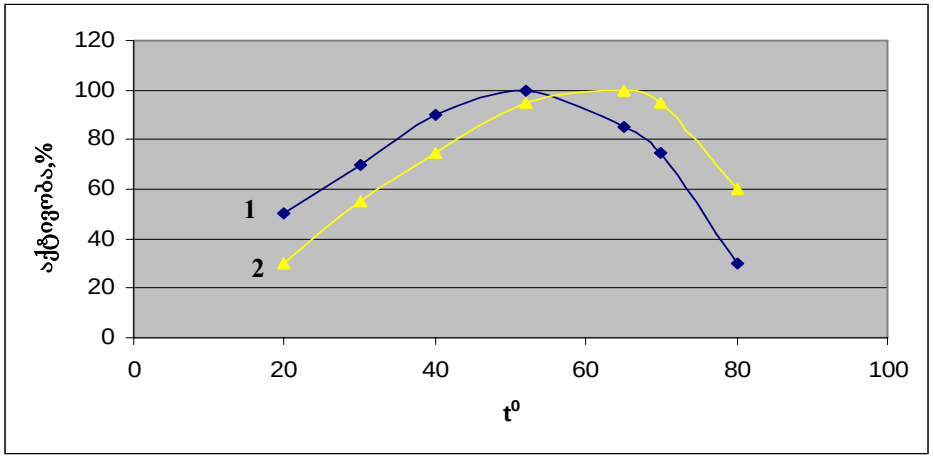
შტამები:
1. *A. niger* S 54
2. A. oryzae B 27

<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. T48 და მეზოფილური *Aspergillus awamori* T23 კულტურები. 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-13 ნახაზზე.

ნახაზი 13

ტემპერატურის გავლენა გლუკოამილაზას ფერმენტულ აქტივობაზე



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

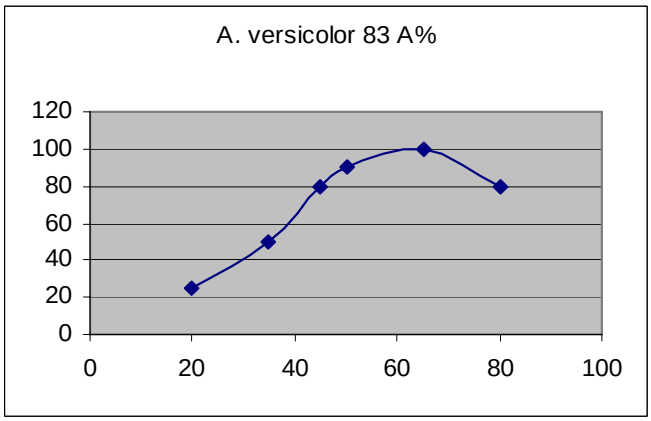
<u>ცდის პირობები:</u>
აცეტატური ბუფერი 0.05 M, pH 4.7; სუბსტრატი 1%-იანი სახამებლის ხსნარი.
<u>ინკუბაციის ხანგრძლივობა:</u> 10 წთ

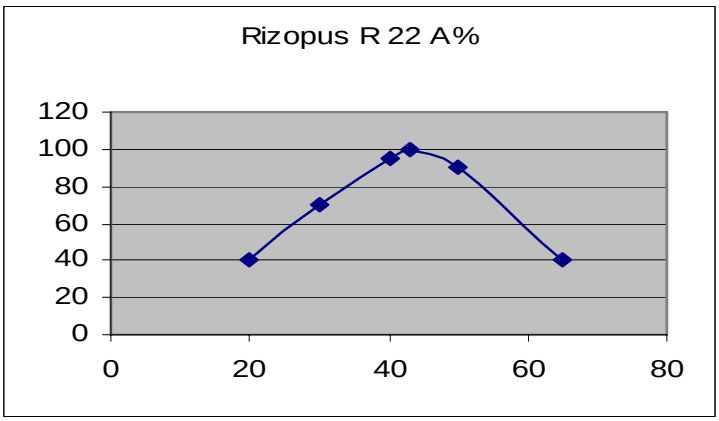
თერმოფილური და მეზოფილური შტამების მიერ პროდუცირებული ცელულაზების შესადარებლად, შესწავლილ იქნა ამ ფერმენტის პროდუცენტები _ *Aspergillus versicolor* S83 და *Rizopus* sp. R22. ტემპერატურული ოპტიმუმის დადგენამ აჩვენა რომ, თერმოფილური კულტურის - *Aspergillus versicolor* S83-ის ცელულაზა მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებს 65^{0}C-ზე, მაშინ როცა მეზოფილური კულტურის - *Rizopus* sp. R22-ის ცელულაზას ტემპერატურული ოპტიმუმია 50^{0}C. (ნახ. 14-ა,ბ).

ნახაზი 14

ტემპერატურის 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
<u>ინკუბაციის ხანგრძლივობა:</u> 60 წთ

5.3 კარბოჰიდრაზების ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების pH ოპტიმუმების დადგენა

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-13 ცხრილში.

ცხრილი 13

კარბოჰიდრაზების მოქმედებების pH ოპტიმუმები

fermentuli preparatebi	producentebi	pH optimumi
α-amilaza	*A. niger* S 54	7.0
	A. niger B 47	3.0
glukoamilaza	*Cladosporium* sp. T 48	7.5
celulaza	*A. versicolor* S 83	3.5
	Absidia sp. K 61	8.2

<u>ცდის პირობები:</u>

<u>ამილაზური პრეპარატებისათვის:</u> ბუფერული ხსნარები: გლიცინ-HCl-ის ბუფერი 0.05M - pH 2.0-3.5, აცეტატური ბუფერი 0.05M - pH 4.0-6.5, ფოსფატური ბუფერი 0.04M - pH 7.0-9.0; სუბსტრატი 1%-იანი სახამებლის ხსნარი. <u>ინკუბაციის ხანგრძლივობა:</u> 10 წთ. t=30°C

<u>ცელულაზური პრეპარატებისათვის:</u>

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

როგორც ცხრილიდან ჩანს, აციდოფილური კულტურების ფერმენტების pH ოპტიმუმები მჟავე არეშია, ალკალიფილური კულტურების ფერმენტები კი მაღალ აქტიურობას ტუტე არეში ამჟღავნებენ. განსაკუთრებულად აღსანიშნავია *Aspergillus*

versicolor S83, 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.

დასკვნები:

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 არატოქსიკური 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.

გამოყენებული ლიტერატურის სია

1. **კვესიტაძე გ., კვესიტაძე ე.** ბიოტექნოლოგია. თბილისი, შ.პ.ს. „ერტრატი", 1999წ.

2. **სტცუ – P-196**, ბიოლოგიური მრავალფეროვნება, ახალბიოტექნოლოგიებში გამოყენების მიზნით
3. **ტყემალაძე გ., კვესიტაძე გ.** პრაქტიკული ენზიმოლოგია. თბილისი, „მეცნიერება," 1975წ გვ 243-253
4. **ხურცილავა დ.** - ბიოტექნოლოგია. თბილისი, 1990წ. გვ 26-36
5. **Азрилевич М. Р.** //Заменители сахара Пищевые ингредиенты // 2001. №2.С42-45
6. **Алексидзе Т.И.** Мутантный штам ***Aspergillus* АТ-490** - продусент целлюлолитических ферментов. Автореферат. Канд. дисс. Тбилиси. 1984. 24 с.
7. **Амилолитические ферменты** и их применение в спиртовой промышленности - 2006
8. **Безбородов А.М.** //биохимические основы микробного синтеза. – М. Легкая и пищевая промышленность. – 1984. – 304.
9. **Бечина Е.М., Гернет М.В., Логинова Л.Г., //** Влияние условий культивирования на биосинтез α-амилазы\\ Фермент и спирт. Промышленность. – 1983. – №1. – С.34 – 36.
10. **Билай В.И.** Основы общей микологий. – Киев. Главное изд-во издательского объединения „Выща школа" - 1989.
11. **Блиева Р.К. //** Изучение биосинтеза ферментов при глубинном культивировании плесневых грибов из рода ***Aspergillus*** / Канд. Дисс. Алма- Ата. – 1967.
12. **Галич И.П.** // Амилазы микроорганизмов. Украина. 1987. – С.7 – 14
13. **Гернет М.В.** // Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук. – Москва – 1985.
14. **Грачева И.М. Гернет М.В., Замотаилова Л.П. и др.** //Применение фермента глюкоамилазы для осахаривания крахмалистого сырья \\ фермент и спирт. пром сть.-1876 №2. -С. 39-41.
15. **Грачева И.М. Гернет М.В., Кузина В.М., Саловарова В.Н.** Влиание посевного материала на биосинтез целлюлолитических ферментов. Фермент и срирт. Промышленность. 1982. №8. сю31-33.
16. **Грачева И.М., Кольцова Э.В., Зотова Н.Б.** Характеристика ферментативного комплекса, образуемого дрожжами End. Species // Микроб. Промышл. -1975. - №1. – С. 19-21.
17. **Грачева И.М., Кривова А.Ю. //**Технология ферментных препаратов 3-е изд., перераб. И доп. М. Изд-во „Элевар'' 2000. С-512.

18. **Григоров В.С., Жеребцов Н.А., Щеголов В.В.** Определение плоидности у мутантов Rhizopus pygmacies и биосинтез глюкоамилазы при различных температурах \\Микробиология. – 1986 Т.55., №3. – С.431-434.
19. **Дладцатова Е.А. , Комарова., Воронцова Н.Н., Бурцева Э.И.** //Штамм ***Aspergillus awamori* Т-1 №464 –** продуцент глюкоамилазы \\ ВНИИ продуктов брожения. Авт.св.СССР кл. С12 М15\09,С12 С7104 №753897, заяв.26.07.78 №2652580, опуб.10.08.80.
20. **Жданова Н.Н. Василевская А.И.** - Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте.Киев Наукова Думка 1982. – 154с.
21. **Жеребцов Н.А.** //Амилолитические ферменты в пищевой промышленности. М. Легкая и пищевая промышленность. 1984.- С.160.
22. **Жехов А.** //Новые источники - Сахарная свекла. 2000. №7. С-23.
23. **Зельтинь Р.П. //**Подбор оптимальной среды для биосинтеза целлюлолитических ферментов термотолерантного гриба ***Aspergillus terreus*** - Микробю 1970. 39. №3. с.574-582.
24. **Капулянц К.А., Ваганова М.С., Болгер Д.И., Медведев З.Г. и др.** \\ Тр.ВНИИ синтез, белков, 1974.- Т.2.С.-64.
25. **Карасевич Ю.Н. - Э**кспериментальная адаптация микроорганизмов. – .М. Наука, 1975.- 179с.
26. **Квачадзе Л.Л., Чхартишвили Д.А., Михлин Э. Д., Квеситадзе Г.И.** Влиание состава питательной среды на синтез внеклеточных целлюлаз ***Sporotrichum pulverulentum***. Прикл. Биох. Имикробиол. 1985. 5. с.624629.
27. **Квеситадзе Г. И. - Ферменты микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях**, Москва «Наука» 1990.
28. **Квеситадзе Г.И., Воронцова Н.Н., Гончарова О.Н., Коридзе В.В., Двадцатова Е.А., Квачадзе Л.Л.** // Экзогенные глюкоамилазы плесневых грибов рода ***Aspergillus*** \\ Прикл. Биох. И микроб. М.–1981 – Т. ХУП.С.-572.
29. **Кожемякина О.П., Лосякова Л.С., Федотова Л.М.** Получение и хранение продусента целлюлолитических ферментов. Фермент и срирт. Промышленность. 1985. №3. с.29-31.
30. **Колесникова Н.А., Левитов М.М.. Горская С .В.** - Антибиотики. – 1963. С.-154.
31. **Коновалов С.А.** - Биосинтез ферментов микроорганизмами М. Пищевая промышленность. -1972. –С.-270

32. **Курзина Л.В., Евтихов П.Н., Полунина А.П.** // Определение глюкоамилазной активности ферментных препаратов глюкозооксидазным методом с использованием о- дианидизина и ферроцианида калия \\ Прикл. Биох. и микроб. – 1973. Т. 9., №4.С.621.

33. **Курсанов Л.И.** - Микология. –М. Гос. Уч. Пед. Изд.-во Нарком проса РСФСР. – 1940. С.-480.

34. **Ленгуорси Т.** Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. С. 322-364.

35. **Мазуренко А. Н., Колюнянц К.А., Лосякова А.С., Москвичева Э.П.** // Штамм гриба ***A.niger*** Т.33 – продуцент глюкоамилазы \ \ Авт.св. СССР, кл. С12 К 1\100, С12 Д 13\10, №587157, заяв.24.09.76. №2407896, опуб. 11.01.1978.

36. **Мехтаева Е.А., Бринза А.И.** //Влияние условий культивирования на биосинтез амилолотических ферментов гриба A. flavies \\ Бул. Акад. Штиинца РСС. Молд. Изд. АН Молд. ССР.серия биол. и химич.наук.-1979. №1. С.- 85-86.

37. **Мусаева Т.И.** \\ В кн. Биология и физиология микроорганизмов. Ташкент. Пар. - 1967. С.-15.

38. **Острикова Н.А., Коновалов С.А.** Осовенности мутантного штамма ***Tricholerma viride* 44**. Прикл. Биох. Имикробиол. 1983. 19. №4. с.498-502

39. **Павленишвили М.Д.** - Селекция микроскопических грибов – продуцентов кислотостабильных α-амилази и глюкоамилази //Дисс. канд. биол. Наук –1982– С.45-55.

40. **Панасенко В.Т.** // Экология плесневых грибов \\Микробиология. 1944.- Т.13, №4.- С.158-170.

41. **Панкратов А. Я., Яковлев В.Ф.** // ***Rhizopus delemar*** В - продуцент амилолотических ферментов\\ микробиол. Промышленность. 1971.- №1. С.9-11.

42. **Писаренко Т.Н., Яровенко В.Л., Добролинская Г.М.**\\ Микроб. промышленность.-1971. Т.3.-С.3.

43. **Подгорский В. С., Коваленко Э.А., Колтукова Н.В., Гетман Е. И.** // Деп. биосинтез амилазы *Baccillus mesentericus* d зависимости от состава питательных сред \\микробиол.ж. Киев. 1988. С.- 407.

44. **Поландова Р.Д.** // Пути эффективного использования ферментных препаратов в хлебопекарной промышленности \\ Материала 2-го Всесоюзн. совещ. по ферментам микроорганизмов. – Минск. – 1978.

45. **Прангишвили Д. А.** // Молекуляр. биология 1983. Т. 17. С. 234-248.

46. **Рижакова В.Г., Фениксова.Р.В.** - Получение высокоочищенной глюкоамилазы

Aspergillus awamori .1972г.90 л

47. **Рухлядева А.П., Горячева М.Г.** - Определение амилолитической активности ферментов. Ферментная и спиртовая промышленность, 1960, ст 1-9.
48. **Самсонова Р.А.,Евгенева В.С.** // Изосироп – новое подслащивающее вещество пищевая пром-сть.// Сер. 3. Научно-технич. сборник. М. ЦНИИТЭИ пищепром. 1982. Вып.5. С.11-12
49. **Такаити Оя, Нокои Нобумаса, Сакаи Тасихитэ**. // Использование различных ферментов для получения сахаров из крахмала \\ Ню Фудо индасутори, New Food Ind – 1984. №8. P. 16 - 21.
50. **Ташпулатов Ж., Джалалова Х., АбдулаевТ., Мирзахимова М.** В кн.: Целлюлазы микроорганизмов. М. "Наука". 1981. с.114-124
51. **Терещенко Е.Н.** //Особенность аппаратурного оформления ферментного цеха Воскресенского спиртового завода \\ Фермент и спирт. Промышл. – 1983. №3.- С.25-28.
52. **Тихомирова А.С.** //Индуцированный анализ амилази ***Aspergillus orizae*** \\ Дисс. канд.биол. наук. М.-1964.
53. **Тунова Н.А., Родионова Н.А., Мартиеов Л.И.** Ферментативная система ***Geotrichum candidum*** гидролизирущая целлюлозу. Прикл. Биох. Имикробиол. 1980. №16. с. 40-45.
54. **Фениксова Р.В., Рыжакова В.Г.** // Глюкоамилаза, образующаяся в глубинной культуре гриба ***Aspergillus awamori*** \\ Прикл. Биохимия и микроб.- 1966.-Т.2.-С.144.
55. **Шинкаренко Н.Т., Калунянц К.А., Лосякова Л.С..Складнев А.А.** // Питательная среда для культивирования продуцентов глюкоамилазы \\ опуб. В.Б.И., 1983. А.с. 1024500.
56. **Юркевич В.В., Шурыгина Н.Н.** // Механизм влияния крахмала на биосинтез α-амилазы ***Aspergillus orizae***\\ Ghbrk Биохим. и микробиол.-1972.-Т.8.вып.5.-С.515-519.
57. **Яровенко В.Л., Марчиненко В.А., Смирнов В.А и др.** //Технология спирта \\ Под редакцией проф. В.Л Яровенко., М. ,,Колос- Пресс”. 2002.
58. **Abdel-Hafez, S.I., A.H. Maubasher, and H.M. Abdel-Fattah.** 1978. Cellulose decomposing fungi of salt marshes in Egypt. Folia Microbiol. (Praha) 23(1):37-44.
59. **Abe Jun-ichi, Bergmann Frederico N., Obeta Kazaeki, Hizikuri Susami**, Raw-starch digesting enzymes of *Aspergillus*. Sp. 1985. - Vol. 31, #2. P. 125-135.
60. **Abe, J.-I., K. Nakajima, H. Nagano, S. Hizukuri, and K. Obata.** 1988. Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* sp. K-27: a synergistic action of glucoamylase

and alpha-amylase. Carbohydr. Res. **175:**85-92.

61. **Abellana, M, J. Benedi, V. Sanchis, and A.J. Ramos.** 1999a. Water activity and temperature effects on germination and growth of Eurotium amstelodami, E. chevalieri and E. herbariorum isolates from bakery products. J. Appl. Microbiol. 87(3):371-80.
62. **Abellana, M., X. Magri, V. Sanchis, and A.J. Ramos.**1999b. Water activity and temperature effects on growth of Eurotium amstelodami, E. chevalieri and E. herbariorum on a sponge cake analogue. Int. J. Food Microbiol. 52(1-2):97-103.
63. **Adams M.W.W. and Kelly R.M.** (1995) Enzymes Isolated from Microorganisms That Grow in Extreme Environments. *Chemical and Engineering News* **73**, 32-42.
64. **Adams, P. R.** 1994. - Extracellular amylase activities of *Rhizomucor pusillus* and *Humicola lanuginosa* at initial stages of growth. - Mycopathologia **128:**139-141.
65. **Adams, P. R., and J. J. Deploey.** 1976. Amylase production by *Mucor miehei* and *M. pusillus*. Mycologia **68:**934-938.
66. **Aguilar, A.** 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. FEMS Microbiol. Rev. **18:**89-92.
67. **Aiello C, Ferrer A, Ledesma A.** 1996. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. Bioresour Technol. 57:13-18
68. **Aleshin A., Stoffer B., Firsov L., Svensson B., Honzatko R**. // Biochemistry, 1996. V.35. P.8319-8328.
69. **Alexandrov, V. Y.** 1977. Cells, molecules and temperature. Translated from the Russian by V. A. Bernstam. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
70. **Allen A.L., Andreotti R.L.** - Continuous culture of ***Aspergillus phoenicis* QM 329** for the production cellobiase. Biotechnol. Bioeng. 1982. 24. p. 2747-2751.
71. **Allen A.L., Mortensen R.E.** - Production of cellulose from ***Trichoderma* reesei** in fed-batch fermentation from soluble carbon source // Biotechnol. and bioeng. -1981. –vol. 23, №11. C.2641-2645.
72. **Allen M. B.** // Arch. Microbiol. 1959. Vol. 32. P. 270-277.
73. **Ames, L. M.** 1961. A monograph of the Chaetomiaceae. U.S. Army Res. Dev. Ser. **2:**126-251.
74. **Andrezejczuk-hybel J., Kactowski S.** - Condition and course of accumulation and excretion of amylases in cultures of ***Aspergillus orizae*** //Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol. 1971. –Vol. 19. №5. –313-316. 114. Apdegraff, 1969
75. **Aquino A. C. M. M., Jorge J. A., Terenzi H. F., Polizeli M. L. T. M.** - Studies on a thermostable **a-amylase** from the thermophilic fungus Scytalidium thermophilum -

Appli.ume 61, N 4, P. 323 - 328, Date: May 2003.

76. **Arja Miettinen-Oinonen - *Trichoderma reesei*** strains for production of cellulases for the textile industry - *To be presented with the permission of the Faculty of Biosciences of the University of Helsinki, for the public criticism in the Auditorium 1041 at the* Department of Biological and Environmental Sciences, Biocenter 2, Viikinkaari 5, Helsinki, on November 5th, 2004.

77. **Arja MO, Londesborough J, Joutsjoki V, Lantto R, Vehmaanperä J.** 2004. Three cellulases from ***Melanocarpus albomyces*** for textile treatment at neutral pH. Enzyme MicrobeTechnol.34:332-341.

78. **Arnesen, S., S. H. Eriksen, J. Olsen, and B. Jensen.** 1998. Increased production of a-amylase from Thermomyces lanuginosus by the addition of Tween 80. Enzyme Microb. Technol. 23:249-252.

79. **Asker, D., and Y. Ohta.** 2002. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely canthaxanthi-producing archaeon from solar saltern in Alexandria (Egypt). Int. Syst. Evol. Microbiol. 52(3): 729-738.

80. **Atalla RH.** 1993. The structures of native celluloses. In: Foundation for biotechnical and industrial fermentation research. Atalla, RH. Ed.; Espoo: Finland. 8: 25-39.

81. **Auricchio F., Bruni C.B., Sica V.** – Further purification and characterization of the acid a-glucosidase // The biochemical J. – 1968. – Vol.108, #2. – P. 161-167.

82. **Awao T., Otsuka S.** (1974). Notes on thermophilic fungi in Japan(3), Trans. Mycol. Soc. Japan.15, 7-22.

83. **Bajpai P.** 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol Prog.15 :147-157.

84. **Barbesgaard PO, Jenson GW, Holm P.** 1984. Detergent cellulases.U.S.Patent. No.4,435,307. Novo Industries A/S Denmark.

85. **Barnes H. L., and A. W. Rose.** 1998. Origins of hydrothermal ores. Science **279:**2064-2065.

86. **Barnett H. L., and B. B. Hunter.** 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathology Society, St. Paul, Minn.

87. **Barnett, E. A., and C. L. Fergus.** 1971. The relation of extracellular amylase, mycelium, and time, in some thermophilic and mesophilic *Humicola* species. Mycopathol. Mycol. Appl. **44:**131-141.

88. **Beardall, J. & Entwisle, L.** (1984). Internal pH of the obligate acidophile ***Cyanidium caldarium*** Geitler (Rhodophyta?). *Phycologia* **23**, 397-399.

89. **Beguin P., Aubert J. P.** The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol.

Rev.,1994. V.13. P 25-58.

90. **Beishuizen J.W.** - Enzymatik Production of specialize syrups from New Zealand groin maize and wheat chain. №7. 1982 Vol.46. №6–P.125-1

91. **Belly, R. T., M. R. Tansey, and T. D. Brock.** 1973. Algal excretion of ^{14}C-labeled compounds and microbial interactions in *Cyanidium caldarium* mats. J. Phycol. **9:**123-127.

92. **Bhat KM, McCrae SI, Wood TM.** 1989.The endo (1-4)-β-D-glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: isolation, purification and characterization of five major endoglucanase components. Carbohydr Res. 190: 279-329.

93. **Bhat, M. and Bhat, S.** 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv*. 15:583.620.

94. **Bilal Balkan and Figen Ertan** - Production and Properties of α-Amylase from ***Penicillium chrysogenum*** and its Application in Starch Hydrolysis - Preparative Biochemistry & Biotechnology (Taylor & Francis – Turkey); Volume 35, Number 2 / 2005; p 169 – 178

95. **Bois, G., A. Bertrand , Y. Piche, M. Fung, and D.P. Khasa.** 2005. Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. Mycorrhiza 28;:1-11

96. **Bowles L.L.** - Amylolytic enzymes. Food Sci. Technol., 1996, 75, P.105-129.

97. **Brandani da Silva William and Rosane Marina Peralta Can.** J. Microbiol./Rev. can. microbiol. 44(5): 493-497 (1998) - Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from ***Aspergillus fumigatus***

98. **Brock, T. D.** (1978). Thermophilic microorganisms and life at high temperatures, pp. 465. Springer-Verlag, New York

99. **Brock, T. D., and J. L. Mosser.** 1975. Rate of sulfuric-acid production in Yellowstone National Park. Geol. Soc. Am. Bull. **86:**194-198.

100. **Bu'lock J.D., Kristiansen B.** 1987 Basic Biotechnology, Academic Press, London.

101. **Buchalo, A.S., E. Nevo, S.P Wasser, A. Oren, and H-P. Molitoris** 1998. Fungal life in extremely hypersaline water of the Dead Sea: First records. Proceedings of the Royal Society of London 265: 1461-1465.

102. **Butinar L., P. Zalar, J. C. Frisvad, N. Gunde-Cimerman,** *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *51*, 155. doi:10.1016/J.FEMSEC. 2004.08.002.

103. **Campos, L., and C. R. Felix.** 1995. Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea*. Appl. Environ. Microbiol. **61:**2436-2438.

104. **Carvalho, L.M., P.M. Correia, and M.A. Martins-Loucao .** 2004. Arbuscular

mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh. Mycorrhiza 14:165–170.

105. **Cavaco-Paulo A., Cortez J., Almeida L.** 1998. The effect of cellulase treatment in textile Washing processes. J Soci Dyers and Colour.113*:* 218-222.

106. **Chapman E.S.** (1974) Effect of temperature on growth rate of seven thermophilic fuhgi, Mycologia,66,542-546.

107. **Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ, Claeyssens M, Bhat MK.** 1995a. Purification and Characterization of less randomly acting endo-1,4-β-D-glucanase from culture filtrates of *Fusarium* oxysporum. Arch Biochem Biophys. 316: 428-433.

108. **Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ, Claeyssens M, Bhat MK.** 1995b. Purification and mode of action of low molecular mass endo-1,4-β-D-glucanase from *Fusarium* oxysporum. J Biotechnol. 39: 85-93.

109. **Christensen C.M**. - Grain storage studies. XVIII. Maid invasion of wheat Stored for sixteen months at moisture contents below 15per cent.- Gereal Chem., 1955.,v.32, №8, p.107-116.

110. **Cooney D. G., and R. Emerson.** 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W. H. Freeman and Co., San Francisco, Calif and London.

111. **Crisan E.V.** Current concepts of thermophilic fungi.- Mycologia, 1973, 55, #5, 1171-1198.

112. **Cronin A.E. and Post F.J.** 1977. Reports of a dematiaceous hyphomycete from great salt lake, Utah. Mycologia 69: 846-847.

113. **de Hoog, G. S., and A. H. G. Gerrits van den Ende.** 1992. Nutritional-pattern and ecophysiology of *Hortaea werneckii*, agent of human tinea nigra. Antonie van Leeuwenhoek 62:321-329.

114. **Deacon Jim** - The Microbial World: - Thermophilic microorganisms; Temperature ranges of microorganisms (The University of Edinburgh)

115. **Díaz Muñoz Greetchen M.** - Fungal Diversity Present at a Hypersaline Environment in Cabo Rojo, Puerto Rico Determined by haracterization of Isolates and Analysis of Environmental - 2006

116. **Dideier and Azard and Jacques F. Baldensperger** - Amylolytic Enzymes from ***Aspergillus hermebergì (A. niger*** group): Purification and Characterization of Amylases from Solid and Liquid Cultures ~ ***ORSTOM Department of Microbiology, IRCHA, B.P. 1, 91710 Vert-le-Petit (France)*** (Received October 14th, 1981; accepted for publication, December lst, 1981)

117. **Dix, N. J., and J. Webster.** 1995. Fungal ecology. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

118. **Drake J.M.** (1974) XXIV Symp.Soc. Gen. Microiol. Univ. press,pp 41-58

119. **Duarte J. C., Costa-Ferreira M. -** ***Aspergillus*** and lignocellulosics: enzymology and biotechnological application. FEMS Microbiol. Rev., 1994, V.13 P. 377-386.;

120. **Eggins H. O.W., Szilvinui A. von, Allsopp D.** (1972) The isolation of actively growing

121. **Elegir G, Panizza E, Canetti M.** 2000. Neutral enzyme-assisted deinking of xerographic office waste with a cellulase/amylase mixture. Tappi J. 83:71.

122. **El-Kersh T.A. -** Distribution of cellulases and chirinases in marine in-vertebrates-Comp. Biotech. And physiol. 1972. vol. 43, p. 67-70.

123. **Ellis S., Simpson M**. - The chromatography of growth hormone on cellulose derivatives // J.Biol. Chem.1956.-Vol. 220. –P.933.

124. **Erikson K.E.** – Degradation of celluase, Experimentia. 1982. V.38, №2. P.156-159

125. **Erikssen J, Goksoyr J.** 1977. Cellulases from ***Chaetomium thermophile*** **Var.** dissiutum. Eur J Biochem. 77: 445-475.

126. **Eriksson KE, Pettersson B.**1982. Purification and partial characterization of two acid proteases from the white rot fungus ***Sporotrichum pulverulentum.*** Eur. J. Biochem.124: 635-642.

127. **Eriksson KE, Wood TM.** 1985. Biodegradation of cellulose. In: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Higuchi T. Eds. Academic Press New York pp 469- 503.

128. **Eriksson KE.** 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Biotechnol Bioeng.70: 317-332.

129. **Errlich H. L.** // Ibid. Vol. 86. P. 250-352.

130. **Eveleigh DE.** 1987. Cellulase: a perspective. Phil Trans R Soc Lond. 321:435-437.

131. **Extremophiles.** Special issue of Federation of European Microbiological Societies (FEMS) *Microbiology Reviews* **18**, Nos. 2-3; May 1996.

132. **Feller Georges and Charles Gerday** –Psychrophillic Enzymes: Hot topics in cold adaptation - Laboratory of Biochemistry, Institute of Chemistry B6, University of Liège, B-4000 Liège-Sart Tilman,Belgium. Correspondence to G.F. December 2003

133. **Fergus, C. L.** 1969. The production of amylase by some thermophilic fungi. Mycologia **61:**1171-1175.

134. **Fitch W. M.** (1976) J. Mol. Evol. Vol.8, pp. 13-40.

135. **Fitch W. M., Margoliah E.** // Science. 1967. Vol. 155. P. 279-284.

136. **Galinski E. A.**, Adv. Microb. Physiol. **1995**, *37*, 272.

137. **Ganguly R, Mukherjee S.** 1995. Effects of different pure and complex carbon and nitrogen sources on production of cellulases by an isolated strain *Penicillium*

purpurogenum. J Microb Biotechnol.10: 47-58.

138. **Ganiyu Oboh -** Isolation and characterization of amylase from fermented cassava (*Manihot esculenta* Crantz) wastewater - Biochemistry Department, Federal University of Technology, P.M.B. 704, Akure, Ondo state, Nigeria. Accepted 11 August, 2005

139. **Garbatt J.T.** purification of enzymes. US patent. 1967. M3318782.

140. **Gomes I., Gomes J., Gomes D.J., Steiner W.** 2000. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β-glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Appl Microbiol Biotechnol. 53:461-468.

141. **Goyal A, Ghosh B, Eveleigh D.** 1991.Characteristics of fungal cellulases. Bioresour Technol. 36: 37-50.

142. **Guilboult G.G., Rietz E.,** Bernd J., 1976. Enzymeatic Fluorometric assy of **α-amylase** in serum. CIi. Chem. 22. 10, 1702.

143. **Gunde-Cimerman N., L. Butinar,** S. Sonjak, M. Turk, V. Urši˘c, P. Zalar, A. Plemenitaš, in *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (Eds N. Gunde-Cimerman, A. Oren, A. Plemenitaš) **2005**, p. 397 (Springer: Dordrecht, The Netherlands).

144. **Gunde-Cimerman N., P. Zalar, G. S. de Hoog, A. Plemenitaš,** *FEMS Microbiol. Ecol.* **2000**, *32*, 235.

145. **Gusakov AV, Sinitsyn A P, Berlin AG, Markov A V, Ankudimova NV.** 2000. Surface hydrophobic amino acid residue in cellulase molecules as a structural factor responsible for their high Denim washing performance. Enzyme Microb Technol.27: 664-671.

146. **Haasum, I., Eriksen S. H., Jensen B. and Olsen J.** 1991. - Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus ***Thermomyces lanuginosus*** in a sysnthetic medium**.** Appl. Microbiol. Biotechnol. **34:**656-660.

147. **Hanus F. J., Morita R. Y.** (1968). Significance of the temperature characteristic of growth, J. Bacteriol., 95,736-737.

148. **Haska, R, Ohta, Y** (1994). Starch/Starke 46: 480-485;

149. **Hattory Y., Takcuchi J**. - Studies on amulolytic enzymes produced by endomyces ***sp.Part*** 111 Hydrolysis of starch and glucosyl saccharides with amyloglucosidase// Agr. Biol. Chem. – 1962.-Vol.26, №5.–P.316-322.

150. **Hayashida S, Mo K.** 1986. Production and characteristics of avicel disintegrating endoglucanase from a protease-negative *Humicola grisea* var. *thermoidea* mutant, Appl Environ Microbiol. 51:1041-1046.

151. **Hayashida S, Ohta K, Mo K.** 1988. Cellulases from ***Humicola Insolens, Humicola grisea*** In: Kellogg and Wood TM. Eds. Methods in Enzymology, Academic Press,

London: New York, 160:p 323-332.

152. **Hayward TK, Hamilton J, Tholudur A, McMillan D.** 2000.Improvements in titer productivity and yield using solka-floc for cellulase production. Appl Biochem Biotechnol. 84-86: 859-887.

153. **Hildebrant, U., K. Janetta, F. Ouziad, B. Renne, K. Nawrath, and H. Bothe.** 2001. Arbuscular micorrhizal colonization of halophytes in central European salt marshes. Micorrhiza 10: 175-183.

154. **Hiroyuki H., Heiko T., Toshitaka U., Koichiro S.,** 1976. Aotomatic measurements of **α**-amylase activiti during γ-irradiation. Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ. 54. 1, 36.

155. **Hochestein L. I., Dalton B., Pollok G.** – The metabolism of carbohydrates by extremely halopilic bacteria Identification of galactosic acid as aproduct of galactose metabolism, 1976. can. I. Microbiol., v.22 p. 1191-1196

156. **Hoog (de Hoog)G. S., E. Gueho, F. Masclaux, A. H. G. Gerrits van den Ende, K. J. Kwon-Chung, M. R. McGinnis,** *J. Med. Vet. Mycol.* **1995**, *33*, 339.

157. **Horikoshi K.** Agr. and Biol. Chem.1971. Vol.35.P.1407-1414

158. **Horikoshi K.** Ibid.1972.Vol.36.P.285-293.

159. **Horukoshi Kori, Ariba Teruhiko** // A new mikrobial World. Tokyo: Jap. Sci. Soc. Press; B. etc.: Springer, 1982. Vol.12. P. 211.

160. **Hoshino E, Susumo I,** 1997.Enzymes in detergency. In: Van Ee. JH, Misset O, Baas, EJ Eds., Marcel Dekker, NewYork.149-174.

161. **Ihara K., S. Watanabe, and T. Tamura.** 1997. *Haloarcula argentinensis* sp. nov., and Haloarcula mukohataei sp. nov., Two new extremely halophilic Archaea collected in Argentina. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(1): 73-77.

162. **Jaychandran, S., and R. Ramabadran.** 1970. Production of amylase by ***Thermoascus aurantiacus***. Indian J. Exp. Biol. **8:**344.

163. **Jeffries TW, Klungness JH, Marguerite S, Cropsey KR.** 1994. Comparison of enzyme enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. Tappi J. 77: 173-79.

164. **Kathiresan K. and Manivannan S. -** α-Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil Centre of advanced study in Marine Biology, Annamalai University, Parangipettai, 608502, Tamilnadu, India. Accepted 14 December, 2005.

165. **Kang M.K., Rhee Y.H.** 1995. Carboxymethyl cellulases active and stable at alkaline pH from alkalophilic ***Cephalosporium* sp**. RYM-202. Biotech Lett.17: 507-512.

166. **Kawamure S., watanabe T., Matsuda K.** - Hydrolysis of glucobioses by ***A. niger***

glukoamilase // J.Agr. Res. – 1970. –Vol. 31. p.170.

167. **Kelly J.J., Alpera O.H**. – Properties of human intestinal glucoamylase // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – Vol.3, #5, - p.113-120.

168. **Kerr R.W., Cleveland F.C., Katzbeck W.J.** The action of amyloglucosidase on amylase and amylopectin // J. Amer. Chem. Soc. – 1951. Vol. 73. - №3916. 14045. Kolinska j., Kramal J. Separation and characterization of sucras- iso-maltase and of glukoamilase of rate intestine // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. Vol. 284, - P.235-247.

169. **Khandke KM, Vithayathil PJ, Murthy SK.** 1989. Purification of xylanase, β-glucosidase,endocellulase,and exocelluase from thermophillic fungus *Thermoascus auranticus* . Arch Biochem Biophys.274: 491-500.

170. **Kirk KT, Jeffries TW.**1996. Role of microbial enzymes in pulp and Paper Processing, In: Enzymes for Pulp and Paper Processing, ACS symposium Series 655, Ch**.**1:1-13.

171. **Kis-Papo T., A. Oren , S.P. Wasser, and E Nevo**. 2003a. Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. Microb. Ecol. 45(2): 183-90.

172. **Kis-Papo T., V. Kirzhner, S.P. Wasser, E Nevo** .2003. Evolution of genomic diversity and sex at extreme environments: fungal life under hypersaline Dead Sea stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 100(25):14970-5.

173. **Kis-Papo, T., I. Grishkan, A. Oren, S.P. Wasser, and E. Nevo.** 2001. Spatiotemporal diversity of filamentous fungi in the hypersaline Dead Sea. Mycol. Res. 105, 749-756.

174. **Kladwang Wipapat, Lene Lange, Nigel Hywel Jones and Amaret Bhumiratana**. - Alkaline - tolerant fungi as a source for Alkaline Enzymes**,** 2002 Mycology Laboratory, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Thailand

175. **Kogej Tina,A Cene Gostinˇcar,A Marc Volkmann,B Anna A. Gorbushina,B and Nina Gunde-CimermanA,C - Mycosporines in Extremophilic Fungi—Novel Complementary Osmolytes? -** A University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.; B Geomicrobiology, Institut für Chemie und Biologie des Meeres, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, D-26111 Oldenburg, Germany. - Final version: 24 March 2006.

176. **Kolinska J., Kramal J.** – Separation and characterization of sucras-isomaltase and glucoamylase of rate intenstin // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. – Vol.284, - p.235-247.

177. **Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mach RL, Kubicek PEM.** 1993. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle from the interior of a secretory fungus. Enzyme microb Technol.15: 90-99

178. **Kubicek CP.** 1992. The cellulase proteins of *T. reesei*: The structure, multiplicity, mode

of action and regulation formation. Adv Biochem Eng. 45:1-27.

179. **Kumar PKR, Singh A, Schugerl K.** 1991. Formation of acetic acid from cellulosic substrates. Appl Microb Biotechnol. 34: 570-572.

180. **Lachke AH, Bastawade KB, Powar VK and Srinivasan MC.** 1983. Enhanced production of β-D glucosidase by *Penicillium funiculosm in* submerged culture. Biotechnol Lett. 5*:* 649-652.

181. **Lachke AH, Bastawade KB, Powar VK and Srinivasan MC.** 1986. Isolation of hyper cellulolytic mutant (CU-1) of *Penicillium funiculosum.* Enzyme Microb Technol.8: 105-109.

182. **Lachmund A, Urmann U, Minol K, Wirsel S, Ruttkowski E** (1993). Regulation of _-amylase formation in ***Aspergillus oryzae*** and ***Aspergillus nidulans*** transformants. Curr. Microbiol. 26: 47-51.

183. **Lahav R., P. Fareleira, A. Nejidat, A. Abeliovich**, *Microb. Ecol.***2002**, *43*, 388. doi:10.1007/S00248-002-2001-4.

184. **Laluce Cecilia, Bertolini Maria Celina, Ernandes Jpse Roberto, Martini Ann Vaughan, Martini Alessandro** // Appl. And Environ Microciol. -1988.- Vol. 54, №10.- P.2447-2451.

185. **Landwehr M., U. Hildebrandt, P. Wilde, K. Nawrath, T. Toth, B. Biro, and H. Bothe.** 2002. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. Mycorrhiza.12(4):199-211.

186. **Lee B.H., Blackburh T.H. -** Cellulases production by a thermophylic *Clostridium* Species, Appl. Env. Microbiol, 1975, 30, #3, p. 346-353.

187. **Lindt, W.** 1886. Mitteilungen über einige neue pathogene Shimmelpilze. Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 21:269-298.

188. **Mac-GregorE.A.** // Structure and activity of some starch-metabolizingenzymes. Prog. Biotecnol., 1996, 12, P. 109-124.

189. **Madigan MT & Marrs BL.** (1997) Punishing Environments: Extremophiles. *Scientific American* issue 4.

190. **Madigan MT, Martinko JM and Parker J.**, (1997) *Brock Biology of Microorganisms*. Eighth edition.. Prentice Hall.

191. **Maheshwari, R., Bharadwaj, G. and Bhat, M.** 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes**.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. Vol. 64: p. 461-488.

192. **Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C.** 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *In:* Gaden, E.L., Mandels, M.H., Reese, E.T. and Spano, L.A. (eds.) Biotechnology and Bioengineering Symposium No 6. John Wiley and Sons, New York.

Pp. 21.33.

193. **Manjunath P., Shenoy B.C., Roghavendra Rao M.R.** //Fungal glucoamalases //J. Appl. Biochem. -1983. – Vol.5, №4/5. – P.235- 260.

194. **Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN.** 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. Biotechnol Prog.15: 804-816.

195. **McHale A, Coughlan MP.** 1980. Synergistic hydrolysis of cellulose by components of extracellular cellulase system of *Taleromyces emersonii,* FEBS Lett. 117:319-322.

196. **Miehe, H. 1930.** Die Wärmebildung von Reinkulturen im Hinblick auf die Ätiologie der Selbsterhitzung pflanzlicher Stoffe. Arch. Mikrobiol. 1:78-118.

197. **Miehe, H. 1930.** Über die Selbsterhitzung des Heues. Arb. Dtsch. Landwirtsch.-Gesellsch. Berlin 111:76-91.

198. **Mishra, R. S., and Maheshwari R.** 1996. Amylases of the thermophilic fungus ***Thermomyces lanuginosus***: their purification, properties, action on starch and response to heat. J. Biosci. 21**:** 653-672.

199. **Montalvo-Rodríguez, R., J. López-Garriga, R.H. Vreeland, A. Oren, A. Ventosa, and M. Kamekura.** 2000. *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. Int. J. Syst. Bacteriol. 50: 1065-1071

200. **Montalvo-Rodríguez, R., R.H. Vreeland, A. Oren, M. Kessel, C. Betancourt, and J. López-Garriga,** 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. Int. J. Syst. Bact. 48: 1305-1312.

201. **Montenecourt B S.1983.** *Trichoderma reesei* cellulases. Trends Biotechnol.1: 156-161.

202. **Moreira F.G., De lima F. A., Pedrinho S.R. F., Lenartovicz V., De Souza C.G.M.,Peralta R, M.** //Production of amylases by *Aspergillus Tamari*.// Department de Bioguimika, Universidad de Maringa, Brazil .Rev Microbiol. Vol 30.n 2 Sao Paulo. 1999

203. **Mouchacca, J.** 1997. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. Cryptogam. Mycol. **18:**19-69.

204. **Murashima, K., Moriya, T., Hamaya, T., Koga, J., Sumida, N., Aoyagi, K., Murakami, T and Kono, T.** 2000. Enzyme endoglucanase and cellulase preparations containing the same. Pat. US 6,159,720.

205. **Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T. and Kono, T.** 2002. Purification and characterization of new endo-1,4-β-D-glucanases from *Rhizopus oryzae. Enzyme Microb. Technol*. 30:319.326.

206. **Nieves-Rivera, A.** 2005. Coastal Mycology of Puerto Rico: A Survey and Biological Aspects of Marine, Estuarine, and Mangrove Fungi. Doctoral dissertation. University of Puerto Rico, Mayagüez Campus.

207. **Noack, K.** 1920. Der Betriebstoffwechsel der thermophilen Pilze. Jahrb. Wiss. Bot. **59:**593-648.

208. **Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R** (2000). Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 31: 135-152.;

209. **Pazur J. H., Knull H.R. and Cerure A**.// Carbohydr. Res.- 1971.-Vol.20.-P.83-96.

210. **Petrovič, U., N. Gunde-Cimerman, and A Plemenitas,.** 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast Hortaea werneckii. Molec. Microbiol. 45(3): 665-672.

211. **Prista, C., A. Almagro , M.C. Loureiro-Dias, and J. Ramos.** 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii.* Appl. Environ. Microbiol. 63(10):4005-9.

212. **Quang D**, Nguyen, Judiet M, Rezessy- Szabo , Agoston Hoschke (2000). Optimization of composition of edia for the production of Amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. Food. technol. Biotechnol. 38 (3): 229-234.

213. **Ramos J.**, in *Recent Research Developments in Microbiology* (Ed. S. G. Pandalai) 1999, p. 377 (Signpost: Trivandrum, India).

214. **Rani Gupta, Paresh Gigras, Harapriya Mohapatra, Vineet Kumar Goswami, Havna Chauhan** (2003). Microbial _α-amylases: a biotechnological perspective.Process Biochem 38: 1599-/1616.

215. **Rao DV, Shivannavar CT, Gaddad SM** - Bioleaching of copper from chalcopyrite ore by fungi - Department of Studies and Research in Microbiology, Gulbarga University, Gulbarga 585 106, India. - Indian J Exp Biol. 2002; 40(3):319-24 (ISSN: 0019-5189);

216. **Rath Chandi C.** - Thermophiles : A novel group of microorganisms for 21st century - Centre for Post Graduate studies in Microbiology, OUAT, Bhubaneswar, India-751003.

217. **Rath, C. C. and Subramanyam , V. R**. (1997). A note on thermotolerant cellulolytic fungi from a hot spring at Taptapani, Orissa, Microbios. 89 : 157-161.

218. **Rath, C. C. and Subramanyam, V. R.** (1998b). Therostable amylase activity of fungi isolated from a hot spring. Fungi in Biotechnology. (ed) Anil Prakash, CBS Publishers and Distributors, New Delhi. pp. 93-98.

219. **Regina S. Redman, Anastassia Litvintseva, Kathy B. Sheehan, Joan M. Henson, and Rusty J. Rodriguez -** Fungi from Geothermal Soils in Yellowstone National Park **-** Applied and Environmental Microbiology, December 1999, p. 5193-5197, Vol. 65, No. 12

220. **Roberts Dave** - Eukaryotes in extreme environments - (5 February 1998), Zoology Department

221. **Roberts M. F.,** *Saline Systems* **2005**, *1*, 5. doi:10.1186/1746-1448-1-5.

222. **Rothschild, L. J., Giver, L. J., White, M. R. & Mancinelli, R. L.** (1994). Metabolic activity of microorganisms in evaporites. Journal of Phycology 30, 431-438

223. **Roy SK, Dey SK, Raha SK, Chakrabarty SL.** 1990. Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliopthora thermophila* D-14 (ATCC 48104).J Gen Microbiol. 136:1967-1671.

224. **Ruiz-Suárez, J.** 2004. Arenicolus filamentous fungi in Mayagüez Bay shoreline, Western Puerto Rico. Master Thesis. University of Puerto Rico, Mayagüez Campus.

225. **Rutlloff H., Taafel A., Zucker T., Schierbaum F., Richter M.** //The ways of glucoamylase obtaining. // DDR Patent -1968. №60536

226. **Ryu DDY, Mandels M.** 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. Enzyme Microb Technol. 2: 91-102.

227. **Sabin R.D. and Wasserman B.P.**// J. Agr. Food Chem. -1987. P.649- 651.

228. **Sadhukhan, R., S. K. Roy, S. K. Raha, S. Manna, and S. L. Chakrabarty.** 1992. Induction and regulation of a-amylase synthesis in a cellulolytic thermophilic fungus Myceliophthora thermophila D14 (ATCC 48104). Indian J. Exp. Biol. 30:482-486.

229. **Sastry M, Kumar A, Mukherjee P.**2001. Phase transfer of aqueous colloidal gold particles into organic solutions containing fatty amine molecules. Colloids Surf. A: Physiochemical and Engineering Aspects. 181: 255-259.

230. **Schleper, C., Pühler, G., Kühlmorgen, B. & Zillig, W.** (1995). Life at extremely low pH. Nature 375, 741-742

231. **Schou Charlotte, Christensen Margrethe H.. and Martin Schu> Lein."** - Characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Humicola insolens* - Lùvens kemiske Fabrik, Ballerup, DK-2750, Denmark, and .Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, DK-2880, Denmark Biochem. J. (1998) *330*, 565±571 (Printed in Great Britain)

232. **Schülein M, Tikhimirov DF, Schou C.** 1993.*Humicola Insolens* alkaline cellulases. Proc. of second Tricel Symposium on *Trichoderma reesei cellulases* and other hydrolases. 8: 109-116.

233. **Schülein M.**1997.Enzymatic properties of cellulases from Humicola nsolens. J Biotechnol. 57:71-81

234. **Sen Sribitr., Abraham T.K., Charakabarty S.L.** - Charakteristics of the cellulase produced by ***Myceliophtora thermophile* D-14**. Can. J. Microbiol. 1982. 28. #3, p. 271-177.

235. **Sen Sribitr., Abraham T.K., Charakabarty S.L. -** In. Adv Biotechnol. Proc. 6th Int. ferment. Symp. London (Canada) 20 July, 1980, v.2. Toronto. E.a., 1981, p. 633-637.

236. **Shoemaker S, Watt K, Tsitovsky G, Cox R.** 1983. Characterization and properties of

cellulases purified from *Trichoderma reesei* strain L27 Bio / Technol.1:687-690.

237. **Siesjo B.K., Ponten U.** - Intracellular pH-true parameter or misnomer. Ann.N. Y.Acad.Sci.,133, 78-86.

238. **Siesjo B.K.,Ponten U. -** Intracellular pH-true parameter or misnomer. Ann.N. Y.Acad.Sci.,133, 78-86.

239. **Souza K.A., Deal P. H., Macr H. M., Turnbill E. E.** - Appl. Microbiol. 1974. Vol.28P.1066-1068.

240. **Starkey R. L., Waksman S. A.** // J. Bacteriol. 1943.Vol. 45. P. 509-519.

241. **Sterflinger K.,** *Antonie Van Leeuwenhoek* **1998**, *74*, 271. doi:10.1023/A:1001753131034

242. **Stetter K. O.** (1996) Hyperthermophiles in the History of Life. in *Evolution of Hydrothermal Ecosystems on Earth (and Mars?)*. Edited by GR Borck & JA Goode. John Wiley & Sons.

243. **Stetter, K. O.** 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett**. 452:**22-25.

244. **Stout, R. G., M. Kerstetter, M. Summers, and T. McDermott.** 1997. Heat- and acid-tolerance of a grass commonly found in geothermal areas within Yellowstone National Park. Plant Sci. **130:**1-9.

245. **Taber R. A., Pettit R.E.** (1975). Occurrence of thermophilic microorganisms in peanuts and peanut soil, Mycologia,67,157-161.

246. **Takeichi y., Ohmure K., Nakayama A. et al.**//Ibrid. -1983. – Vol.n 47, №1. – P.159-161.

247. **Tansey M. R.** (1972) Effect of temperature on growth rate and development of the thermophilic fungus ***Chaetomium thermophile***, Mycologia, 64, 1290-1299.

248. **Tansey, M. R. and Brock, T. D. (1978).** Microbial life at high temperatures: ecological aspects. In *Microbial life in extreme environments* (Ed D. J. Kushner). p.159-194. Academic Press, London.

249. **Tansey, M. R., and T. D. Brock.** 1971. Isolation of thermophilic and thermotolerant fungi from hot spring effluents and thermal soils of Yellowstone National Park. Bacteriological Proceedings 1971, p. 36. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

250. **Tansey, M. R., and T. D. Brock.** 1973. *Dactylaria gallopava*, a cause of avian encephalitis, in hot spring effluents, thermal soils and self-heated coal waste piles. Nature **242:**202-203

251. **Tansey, M. R., and T. D. Brock.** 1978. Microbial life at high temperatures: ecological aspects, p. 1-24. *In* D. J. Kushner (ed.), Microbial life in extreme environments. Academic

Press, London, United Kingdom

252. **Teeri TT.**1997.Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. TIBTECH. 15:160-167.

253. **The Maikrobial World:** Thermopilic microorganismes (Produced by Jim Deacon Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh)

254. **Tomar Mamta, Ai-Essa Razak J., Ai-Knayat Tarig H.A**.// Production of glucoamylase by *Aspergillus* species isolated from soil // J.Biol. Sci. Res. – 1989.Vol. 20, №1.–P.95-103.

255. **Tosi, L. R. O., H. F. Terenzi, and J. A. Jorge.** 1993. Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Can. J. Microbiol. **39:**846-852.

256. **Trujisaka Y., Tukumoto J., Yamamoto T.** // Specificity of crystalline saccharogenic amylase of moulds // Nature. 1985. Vol. 181. P. 770-781.

257. **Tsiklinskaya, P.** 1899. Sur les mucédinées thermophiles. Ann. Inst. Pasteur (Paris) **13:**500-515.

258. **Tsujno K., Yoshimura M., Umeki K., Maemiura N., Yamamoto T.,** - Glukose-froming amylase in human liver// J. Biochem. – 1974. – Vol. 76, #6. P1235-1242.

259. **Victieva A.K., Tsekova K.V., Ganchev I.** Influence of the agr of vepore material on the biosynthesis of glucoamylase With strain ***A.niger*** B77// -1984. –Vol.37, №12. P.1685-1687.

260. **Vyas Santos R.** - Characterization of Alkali stable Fungal Cellulases and their Potetial Industrial - Applications, a thesis submited to the University of pune for for the degree of Doctor of Philosopy in Biochemical Scienes National Chemikal Laboratory Pune - 411 008. May, 2004.

261. **Vyas S, Lachke A** 2003.Biodeinking of Mixed Office Waste Papers by alkaline active cellulases from alkalotolerant *Fusarium* Sp. Enzyme Microb Technol. 2: 236-245.

262. **Vyas S, Lachke A, Ahmad A.** 2003. Fungal cellulases for novel industrial applications. In: Rao GP, Manoharachari C, Bhat DJ, Rajak RC, Lakhanpal TN Eds. Frontiers of Fungal Diversity in India. Lucknow: International Book Distributing Co., 143-159.

263. **Vyas S, Lachke A.** 2004. Enzymes for Pulp and Paper manufacturing: Towards Catalyzing Sustainable Development. In: Green Chemistry and Sustainable Development. Dr. M.M. Srivatsva Eds. Allied publishers, New Delhi.

264. **Watanabe K., Fukimbara T.** // Studies on saccharogenic amylase producer by ***A.awamori***. P. V. On the presence of two types of saccharogenic amylase // J. Ferment. Technol.n -1965. №43. P.690-696.

265. Wat**anabe K., Tukimbara T.** // Production of saccharogenic amylass of ***Rhizopus*** by

submerged culture. IV. Purification and general properties of saccarogenic amylase produced by ***Rhizopus*** javanicus/ J.Ferment. Technol. 1968. Vol. 46, №12. P.992-999.

266. **Wheals AE, Basso LC, Denise MG, Amorim HV.** 1999. Fuel ethanol after 25 years. Trends in Biotechnol. 17: 482-487.

267. **Whitaker, R. H.** 1975. Communities and ecosystems. MacMillan Publishing Co., New York, N.Y.

268. **William Brandani da Silva and Rosane Marina Peralta** Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol. 44(5): 493-497 (1998) - Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*

269. **Williams DM and Embley TM** (1996). Annual Review of Ecology and Systematics **27**, 569-595.

270. **Wood TM, McCrae SI.** 1982. Purification and some properties of a (1,4)-β-D-glucan glucohydrolase associated with the fungus *P. funiculosum*. Carbohydr Res. 110: 291-303.

271. **Wood TM.** 1992a. Microbial enzymes involved in degradation of cellulose component of plant cell wall, In: Rowett Research Institute Annual Report, p 10-24.

272. **Wood TM.** 1992b. Fungal cellulases. Biochem Soc Trans. 20: 46-53.

273. **Yabuki M, Ono N, Hoshino K, Fukui S** (1977). Rapid induction of amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae* . Appl Environ. Microbiol. 34: 1-6.

274. **Zalar P., G. S. de Hoog, H. J. Schroers, J. M. Frank, N. Gunde-Cimerman,** *Antonie Van Leeuwenhoek* **2005**, *87*, 311. doi:10.1007/S10482-004-6783-X.

275. **Zalar, P., G.S. de Hoog, and N. Gunde-Cimerman.** 1999a. *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. Stud. Mycol. 43: 57-62.

276. **Zhu J. K**., *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001, 4, 401. doi:10.1016/S1369-5266(00)00192-8.

277. **Берестецкий О.А.** Об изменении почвенной микрофлоры плодовыми растениями в связи с токсичностью садовых почвю – В кн. Материалы первого межвуз, совещ. по агрофитоценологии. Казань, 1969.

278. **Билай В.И., Э.З. Коваль.** Аспергиллы. Киев.Наукова думка 1988.

279. **Горленко М. В.** Жизнь растений. Москва Просвещние 1976. Т.2.ст.380-387.

280. **Дудка Н.А. и др.** Методы экспериментальной микологии. 1982. ст. 439.

281. **Звягинцев Д.Г. и др.** Методы почвенной микробиологии и биохимии из. Моск. Унив. 1980. ст.12.

282. **Литвинов.** Определитель микроскопических почвенных грибов, Ленинград. 1967.

283. **Литвинов.** Определитель микроскопических почвенных грибов, Ленинград. 1967.

284. **Пидопличко Н.М., Милько А.А.** Атлас мукоральных грибов., Киев, 1971.

285. **Пидопличко Н.М., Милько А.А.** Атлас мукоральных грибов., Киев, 1971.

286. **Спесивцева И.А.** Методы определения токсичности кормов \\ Методы исследования в ветеринарской микологии.-М. Изд.Колос, 1971. с.224-235.
287. **Фомин, Г.С., Фомин, А.Г.** (2001) Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Москва, ВНИИ стандарт.
288. **Arxvon J.A.** The genera of fungi sporulating in pure culture Gramer Lehze, 1970.
289. **Dawlgvist A.** Determination of maltase and izomaltase activities with glukose oxidize reagent // J. Biochem, 1961, V.80. #3 p.547-551.
290. **Ghose T.K.** Measurement of cellulase activities Pure Appl. Chem., 1987, 59, p.257-268.
291. **Kreisel H.** Grundzuge eines haturlichen systems der pilze Jena; G. Fisher 1969.
292. **Lengworthy T.** Development of microbs under extreme conditions. M. Mir.1981. C. 322-364.
293. **Malloch. Dovid**. Moulds, Their Isolation, Cultivation and Identification. University of Toronto Press. Toronto Buffalo London. 1981.
294. **Nelson N.A.** Protometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. – J. Biol. chem. 1944. 153-157.
295. **Ohga M., Shimizu K., Morita Y.**//Agric.Biol.Chem. 1966.V.30.P.967.
296. **Somogyi M.** Determination of reducing sugars. – J. Biol. Chem., 1952, 195, 199-28.
297. **Waksman S.A.** Soil fungi and their activities. – Soil., Sci 1916, 2, #1, p. 103-105.
298. **Warcup S.H.** The soil-plate method for isolation of fungi from soil-Nature, 1950, 166, #4502, p. 117.