

удк 615.07

А. А. Толчёнов, Д. В. Зубов, А. В. Сергеева

Оперативный метод определения активности целлюлаз

Аннотация. Разработан метод количественного определения целлюлолитической активности, создан реализующий его программно-технический комплекс. Показана эффективность предложенного метода.

1. Введение

Одним из главных факторов, сдерживающих развитие животноводства и птицеводства в России, является недостаток кормового белка и его низкое качество. Широко распространёнными и возобновляемыми источниками углеводного сырья могут служить сельскохозяйственные, бытовые отходы, отходы деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, основным компонентом которых является целлюлоза - высокомолекулярный нерастворимый полимер глюкозы. В основе биологической деградации целлюлозы лежит действие синтезируемых различными микроорганизмами целлюлолитических ферментов [1]. Деструкция целлюлозосодержащих субстратов при помощи высокоактивных целлюлолитических штаммов позволит утилизировать отходы пищевых и зерноперерабатывающих производств и получить кормовой продукт, обогащенный белком и незаменимыми аминокислотами. Процесс получения высокоактивных штаммов предусматривает большое количество экспериментов, в которых нужно сравнивать активности полученных штаммов.

Для проведения скрининга микроорганизмов-целлюлолитиков и осуществления селекции по признаку активности целлюлаз разработан метод с использованием субстрата карбоксиметилцеллюлозы

Работа выполнена в рамках Аналитической ведомственной целевой программы "Развитие научного потенциала высшей школы".

(КМЦ) и его окрашиванием красителем конго-красным. Найдена зависимость между активностью целлюлаз и диаметром зоны просветления, создан программно-технический комплекс, проводящий распознавание зон просветления и расчёт активностей для анализируемых проб. Настоящая работа в основном посвящена рассмотрению технических особенностей разработанной методики.

1.1. Аппаратная часть методики определения целлюлолитической активности

Существует ряд методов определения эндоглюканазной активности — колориметрический метод, вискозиметрический метод, метод Шомоди-Нельсона и многие другие. Однако все эти методы являются трудоёмкими, их невозможно использовать для одновременного тестирования десятков образцов при выполнении селекционных работ. Кроме того, методы основанные на определении химических компонентов образцов неудобны тем что дают не совсем ту информацию, которая нужна для практического применения - деструкция целлюлозы осуществляется различными ферментами, знать количество каждого из них не требуется, но обязательно нужно найти их суммарную целлюлолитическую активность (что собственно и является практически важной характеристикой штамма).

1.2. Получение зон просветления

Известно, что взаимодействие красителя конго-красного с полисахаридом, содержащим связи $\beta(1.4)$ или $\beta(1.3)$ даёт комплекс насыщенного красного цвета, образование которого предотвращается действием β -глюконаз. Этот феномен применяют в чашечном методе диффузии в агар для обнаружения мутантов с целлюлолитической активностью и дифференциации проб с эндо- и экзоглюканазными активностями [2].

Модифицированный метод определения целлюлолитической активности бактериальной культуры заключается в том, что в лунки агаризованной среды, содержащей КМЦ, вносят целлюлозосодержащий фугат культуральной жидкости тестируемых культур. По истечении времени инкубирования лотки со средой обрабатывают красителем конго-красный, при этом вокруг лунок на красном фоне образуются неокрашенные полупрозрачные зоны в форме кольца, размер которых зависит от активности синтезируемых культурой ферментов (чем больше диаметр зоны, тем выше целлюлолитическая

активность). Использование вместо чашек Петри пластиковых лотков позволяет увеличить число одновременно анализируемых проб до 57. Помимо тестируемых проб наносят растворы с известными активностями — так называемые стандарты — что даёт возможность дать оценку активности исследуемого вещества. Применяемые методы микробиологического контроля активности дают лишь качественную оценку, трудоёмки — при помощи штангенциркуля измеряется эквивалентный диаметр диффузионного пятна (пятно не идеально круглое) стандартной пробы и пробы с неизвестной активностью.

В данной работе рассматривается анализ зон просветления при помощи компьютерной техники, что позволяет дать количественную характеристику активности целлюлаз, ускорить анализ, повысить его точность, снизить непроеизводительные трудозатраты и влияние человеческого фактора, улучшить условия труда.

1.3. Получение изображения зон просветления

Ни один из опробованных планшетных сканеров (Epson Perfection 4990, Mustek ScanExpress A3, HP 370) не позволил получать изображения требуемой четкости. Это обусловлено тем, что глубина резкости (допустимое смещение относительно положения точной фокусировки, при котором изображение остается практически резким) одного из лучших образцов массовых сканеров (и превосходящему по этому показателю другие испытанные модели) Epson Perfection 4990 менее 15 мм, а расстояние от краёв лотка до поверхности агара превышает 18 мм. Попытки отсканировать лоток через дно также оказались не удачными. Поэтому для получения изображения лотка было решено использовать цифровую фототехнику. Пробные съёмки показали, что для обеспечения необходимой точности (диаметр пятна должен определяться с точностью до 0,1 мм) разрешение матрицы фотоаппарата должно составлять не менее 7 Мегапикселей. Чтобы избежать заметных геометрических искажений, расстояние от объектива до лотка должно быть достаточно большим (для испытанного фотоаппарата не менее 50 см).

Лоток с зонами просветления помещается на матовое белое стекло, освещаемое снизу. На стекло накладывается маска, представляющая собой плотный лист чёрной бумаги, в центре которого прорезано квадратное отверстие по размерам лотка. Маска необходима для упрощения дальнейшей обработки изображения (в частности

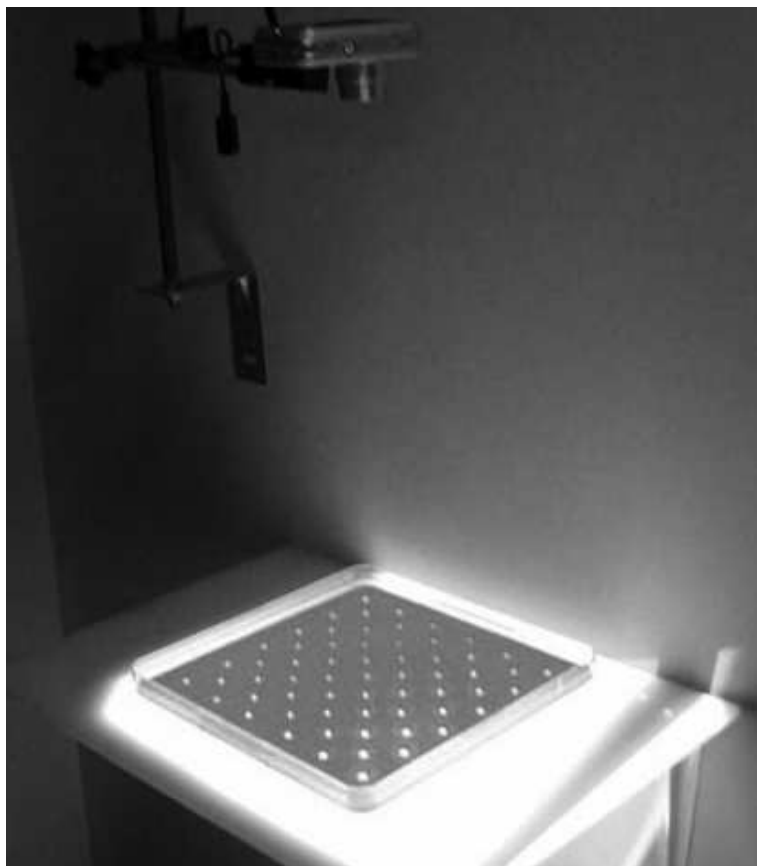


Рис. 1. Общий вид установки для получения изображения лотка (без фотографической маски)

для автоматического определения границ лотка), на снимке будет виден только лоток, так как маска закрывает оставшуюся часть стекла подсветки. Для предотвращения бликов на поверхности агара при фотографировании лотка желательно не использовать посторонние источники света. Полученное изображение передаётся на компьютер по интерфейсу USB. Общий вид установки показан на рис. 1.

2. Описание программы для работы по предложенной методике

Для обработки изображения лотка с агаром на языке C#3.0 создана программа Lizis. Программа работает под управлением операционной системы Windows XP, с установленной средой выполнения .NET Framework 2.0 и выше, позволяет определять диаметры зон просветления и рассчитывать активность исследуемых проб по заданным стандартам. Входными данными являются графические файлы форматов BMP, JPEG, PNG. Результаты расчетов можно распечатать или сохранить в файл на диске.

Работа с программой начинается с загрузки изображения (диалоговое окно «Открыть изображение», меню Файл->Открыть). После загрузки начнется обработка изображения, за ходом которой можно наблюдать в строке статуса в нижней части окна программы. Там же расположена строка подсказок, помогающая пользователю выполнить последующие действия. Для более подробной информации можно обратиться в меню Справка->Инструкция. Обработка изображения может занять заметное время, которое зависит от мощности компьютера и размера изображения. Наиболее важным требованием к аппаратному обеспечению является объем свободной оперативной памяти, который должен быть как минимум в два раза больше размера изображения. В большинстве случаев достаточно 64 Мб свободной оперативной памяти.

Процесс обработки изображения состоит из нескольких этапов. При необходимости изображение лотка вырезается из исходного изображения, затем уточняется положение лунок, после чего программа определяет диаметры зон лизиса каждой лунки.

В левой части окна программы располагается главная панель, с таблицами стандартов и результатов. После загрузки и обработки, изображение выводится справа от главной панели. На него наносятся описывающие лунки окружности, порядковые номера лунок и найденные зоны просветления. Если диаметр лунки определен неточно, то его можно подкорректировать вручную (меню Сервис->Коррекция диаметра лунки). Далее необходимо ввести индексы проб-стандартов в столбец «Индекс» таблицы стандартов на главной панели, и соответствующие им активности в столбец «Активность». При наличии ряда стандартов одной и той же активности их индексы записываются через запятую. Для разделения целой и дробной части

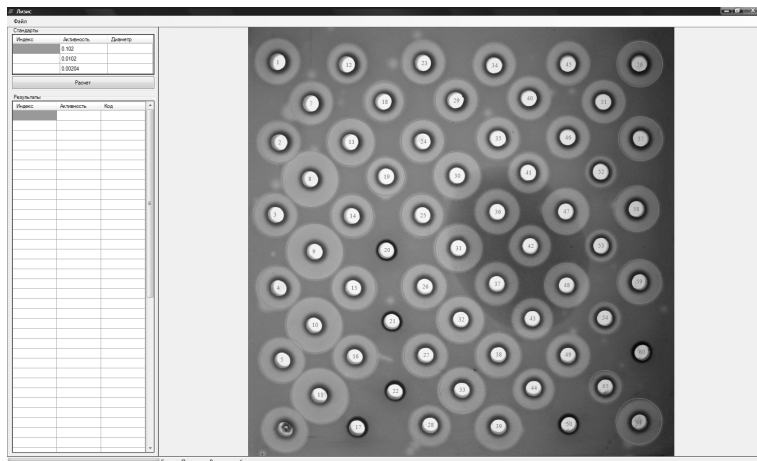


Рис. 2. Скриншот работы программы

чисел используется десятичная точка. После того как будут обозначены 3 стандарта, под таблицей стандартов станет активна кнопка «Расчет», при нажатии на которую программа рассчитает активности всех проб и занесет результаты в таблицу результатов. Можно оценить точность метода, по рассчитанной активности стандартов в результатах.

Полученные результаты можно сохранить или распечатать, выбрав соответствующий пункт в меню Файл. Результаты сохраняются в виде таблицы, в каждой строке которой указывается индекс пятна и его активность.

2.1. Предварительная обработка снимка

Снимок помимо изображения лотка содержит много ненужной графической информации, поэтому желательно вырезать из снимка область с изображением лотка, масштабировать и выровнять его. Это можно сделать вручную с помощью графических пакетов, но это влечет за собой увеличение времени и труда на обработку, может привести к появлению ошибок. Поэтому в программу была добавлена операции автоматического выделения границ лотка, выравнивания его по краям и вырезания изображения лотка из снимка.

Для упрощения поиска границ, используется маска, которая оставляет на снимке только изображение лотка, и сильно увеличивает четкость и контрастность его граней. Пиксели исходного изображения представлены в формате RGB, где интенсивность каждого цветового канала (зеленый, красный, синий) принимает значения от 0 до 255.

2.2. Поиск лунок

Лунки в лотке делаются по разработанному шаблону в шахматном порядке — приблизительное положение каждой лунки в лотке известно заранее. Область лотка разбивается на секторы в виде ромбов, таким образом, чтобы внутри одного сектора была одна лунка. К изображению применяется синий фильтр, при этом лунки остаются светлыми, а агар становится темным (так как он практически не содержит синего цветового компонента). Сектор сканируется, координаты пикселей, яркость которых больше порогового значения, усредняются, в результате получаем координаты центра лунки.

2.3. Определение диаметра зоны просветления

Точность определения диаметра зоны лизиса зависит от многих факторов. Центр лунки принимается за центр зоны лизиса, поэтому точность расположения центра во многом определяет точность определения диаметра зон. Существенное влияние оказывает контрастность и качество снимка (наличие дефектов — различных темных пятен, бликов, неравномерного освещения может ухудшить характеристики поиска). Перед началом обработки к снимку применяется зеленый фильтр, что дает более контрастное изображение. Из центра лунки проводятся концентрические окружности, диаметр которых меняется в диапазоне от 0, до ширины сектора. Для каждой окружности считается среднее значение яркости пикселей лежащих на её длине, полученные значения откладываются на графике BDD (Brightness Distribution on Diameter) по оси абсцисс откладывается радиус, по оси ординат - интенсивность.

На графике можно выделить три «ступеньки», которые соответствуют зонам лунки, лизиса и фона. Скачки между ними являются границами зон, абсцисса середины второго скачка является искомым радиусом, поэтому задача сводится к поиску центра скачка. График просматривается справа налево, это делается так потому, что возможно наличие еще одного скачка, вызванного «орелом» вокруг лунки.

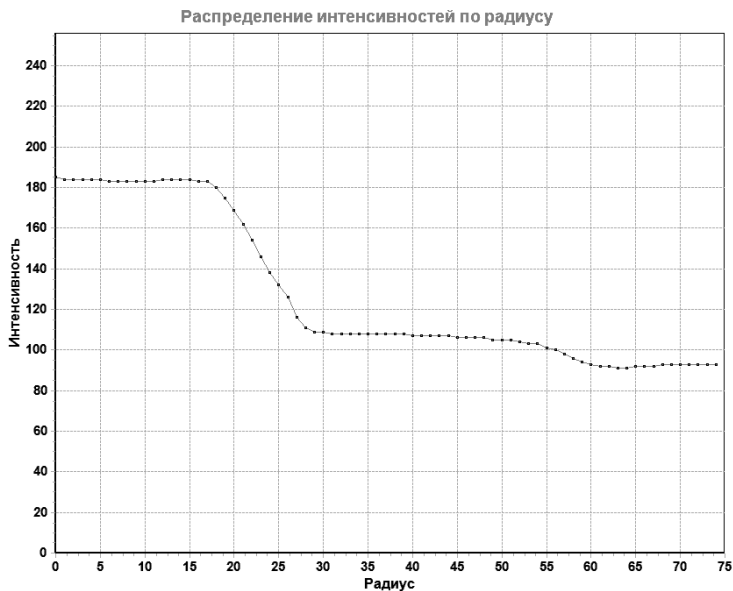


Рис. 3. К определению диаметра зоны лизиса

Выявляется участок, где отклонение ординаты от скользящего среднего больше заданной величины, абсцисса середины этого участка является диаметром зоны лизиса.

3. Построение калибровочной зависимости

По результатам опытов было установлено, что в диапазоне активностей $C = 0,002 \div 0,1$ млФ существует зависимость вида

$$\ln C = aD + b,$$

где D - диаметр зоны просветления. Имея три стандарта, при помощи метода наименьших квадратов легко вывести формулы для расчёта коэффициентов a и b :

$$b = \frac{\sum_{i=1}^3 (D_i \ln C_i) - \frac{\sum_{i=1}^3 \ln C_i \sum_{i=1}^3 \ln D_i}{3}}{\sum_{i=1}^3 (\ln C_i)^2 - \frac{(\sum_{i=1}^3 \ln C_i)^2}{3}},$$

$$a = \frac{\sum_{i=1}^3 D_i}{3} - b \frac{\sum_{i=1}^3 \ln C_i}{3}.$$

Отсюда легко найти по диаметру зоны просветления активность пробы:

$$C = e^{\frac{D-a}{b}}.$$

После отладки системы был проведен ряд опытов: пробы с известными активностями (0,102; 0,0102; 0,00204; 0,00102) наносились на лоток, проводились описанные выше процедуры до получения зон лизиса, выбирались три зоны с разными активностями, использовались в качестве стандартов и определялись активности оставшихся проб. После анализа 120 проб было получено, что для активностей $C = 0,002 \div 0,1$ млФ максимальное отклонение определённой концентрации от истинной не превышало 5 процентов. Пробы с концентрациями 0,00102 Ед/л дают слишком малую зону лизиса (порядка 1 мм), которая плохо определяется и поэтому данный метод не может быть рекомендован для концентраций менее 0,00204 Ед/л.

4. Заключение

Описанный программно-технический комплекс был создан для определения целлюлолитической активности, однако он вполне применим и для определения активностей других ферментов, с аналогичным механизмом формирования зон лизиса. Более того, разработанная система применима для определения активности антибиотиков методом диффузии в агар — механизм появления на агаре зон лизиса иной, чем в описанном в данной работе случае, но созданная система после небольшой настройки справляется и с этой задачей. Разработанное программное обеспечение не требует длительной подготовки персонала, имеет скромные системные требования. Внедрение в лабораторную практику новых инструментов и программ зачастую встречает молчаливое сопротивление со стороны работников, не желающих расставаться с устаревшими, но привычными технологиями, в данном случае этого эффекта удалось избежать — использование штангенциркуля для определения диаметра зон просветления приводит к сильной утомляемости глаз и польза перехода на новый способ определения диаметров была для всех очевидна.

Список литературы

- [1] Лобанок А. Г. Микробиологический синтез белка на целлюлозе. — Минск: Наука и техника, 1976. — 230 с. ↑1
- [2] Sharma P. Limitation of congo-red staining techniques for the detection of cellulolytic activities: *Biotechnol. Lett.*, 1986, V.8. — P. 579-580 с. ↑1.2

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ

A. A. Tolchenov, D. V. Zubov, A. V. Sergeeva. *Effective method for measuring of cellulolytic activity* // Proceedings of Program Systems institute scientific conference “Program systems: Theory and applications”. — Pereslavl-Zalesskij, v. 2, 2009. — p. 207–216. — ISBN 978-5-901795-18-7 (*in Russian*).

АБСТРАКТ. Method for measuring of cellulolytic activity are invented, equipment and software for designed method are created, shown it’s applicability.