

Чепчак Т.П., Олишевская С.В., Курченко И.Н.

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина*

ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *FENELLIA FLAVIPES* И *FUSARIUM OXYSPORUM*

*Изучена активность ферментов целлюлазного комплекса у штаммов *Fenellia flavipes* и *Fusarium oxysporum* в глубинной культуре на средах с растительными отходами в качестве единственного источника углерода. Показано, что большинство исследованных штаммов способны гидролизовать фильтровальную бумагу, лузгу семян подсолнуха, пшеничную солому, кукурузные кочерыжки. Способность к синтезу ферментов целлюлазного комплекса зависела от штамма микроскопического гриба, типа субстрата и продолжительности культивирования. Отобрано два наиболее перспективных штамма: *F. flavipes* 655 с максимумом целлюлозолитической активности 2 ед/мл на среде с пшеничной соломой и 1,6 ед/мл на среде с кукурузными кочерыжками уже на 4-е сутки культивирования, а также штамм *F. oxysporum* 420, образующий в процессе гидролиза кукурузных кочерыжек 0,875 мг/мл редуцирующих сахаров.*

Ключевые слова: микроскопические грибы, целлюлозолитическая активность, редуцирующие вещества, растительные отходы.

Целлюлоза является одним из наиболее распространенных растительных полимеров на нашей планете. Так, ежегодная масса растительного опада составляет около 1×10^{13} т, из которых 4×10^{10} т-целлюлоза [20, 26]. Важным этапом круговорота углерода в природе считают распад целлюлозы, происходящий за счет действия ферментов разных групп микроорганизмов. Особая роль в этом процессе принадлежит микроскопическим грибам, а именно видам таких родов как *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Chaetomium* и др. [16, 23, 21].

Гидролиз целлюлозосодержащих субстратов осуществляется полиферментным комплексом целлюлаз, который состоит из эндоглюканазы, экзоглюканазы и β -глюкозидазы [6, 15].

Ферменты, способные гидролизовать природную целлюлозу, используются в различных отраслях промышленности, в частности, в бумажной при переработке макулатуры. Из такой бумаги в дальнейшем можно получать простые сахара [19]. В пищевой промышленности целлюлазы используются для снижения вязкости фруктовой массы и увеличения выхода сока [28]. Вместе с гемицеллюлазами ферменты целлюлазного комплекса добавляют в корма для животных [24]. Целлюлазы используют также в текстильной промышленности для смягчения ткани, улучшения ее яркости, текстуры и очистки хлопка от загрязнений [19].

Исчерпаемость природных запасов нефти и газа, постоянный рост цен на данный вид продуктов стали причиной разработки новых современных направлений получения энергии альтернативными путями, позволяющими на 90 % снизить выбросы CO_2 в атмосферу. Наиболее перспективным считаются методы получения энергии из растительного сырья с использованием микроорганизмов – продуцентов целлюлаз. Следует отметить и тот факт, что Украина обеспечивает себя топливно-энергетическими ресурсами лишь на 53 % (объем импортированного природного газа составляет 75 %, а нефти и нефтепродуктов – 85 %) [18].

Значительные потери целлюлозосодержащего сырья в виде растительных отходов происходят на предприятиях сельского хозяйства (пшеничная солома, стебли и кочерыжки кукурузы, лузга семян подсолнуха, пшеничные отруби) и других отраслей промышленности, однако они могут быть использованы для синтеза разнообразных органических веществ, таких, как простые сахара, спирты и др. [21]. Наиболее перспективным считается использование пшеничной и ржаной соломы, а также лиственной массы и остатков кукурузы [6, 11, 5].

Целью нашей работы было изучить способность к синтезу ферментов целлюлозолитического комплекса у штаммов *Fusarium oxysporum* и *Fenellia flavipes* на средах с растительными субстратами.

Материалы и методы. *Объекты исследований.* В работе использовали 4 штамма *F. flavipes* и 5 штаммов *F. oxysporum* из коллекции культур микроскопических грибов отдела

© Чепчак Т.П., Олишевская С.В., Курченко И.Н., 2013

физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАНУ. Изученные штаммы были выделены в 2002 году из почв различных регионов Украины. В более ранних исследованиях было показано, что эти штаммы могут использовать нерастворимую целлюлозу (фильтровальную бумагу) в качестве единственного источника углерода [8].

В работе использовали 14-суточные культуры, выращенные на сусло-агаре при $25\pm 2^\circ\text{C}$.

Условия культивирования. Культивирование проводили глубинным методом на качалках (220 об/мин) в колбах Эрленмейера в течение 8 суток при температуре $26\pm 2^\circ\text{C}$ в жидкой минеральной среде Чапека (150 мл). В качестве единственного источника углерода использовали такие растительные отходы, как лузга семян подсолнуха (ЛСП), пшеничная солома (ПС), кукурузные кочерыжки (КК), а также фильтровальную бумагу (ФБ) (марка Ф, плотность 75 г/мг, содержащая около 90,0 % целлюлозы) [7, 13]. Измельченные на лабораторной мельнице МРП-1 субстраты добавляли в количестве 2 % к объему среды. Посев проводили стандартной суспензией конидий грибов (2×10^6) в количестве 5 % к объему среды [13]. Контролем служила среда Чапека с соответствующим субстратом, но без суспензии грибов. Все исследования проводили в 3-х кратной повторности.

Определение ферментативной активности. Определение целлюлозолитической активности (ЦА) микромицетов осуществляли по методу, который основан на связывании динитросалициловой кислоты с редуцирующими сахарами, образующимися в процессе гидролиза субстрата под действием целлюлазных полиферментных систем микромицетов [22]. ЦА определяли на 4-е, 6-е и 8-е сутки культивирования. За единицу общей ЦА принимали такое количество фермента, которое катализирует превращение 50 мг бумаги Ватман №1 в цитратном буфере (рН 4,8–5,0) с образованием 1 мМоля глюкозы за 60 мин при температуре 50°C . Активность целлюлозолитических ферментов выражали в единицах на 1 мл культурального фильтрата [22].

Определение редуцирующих веществ. Содержание редуцирующих веществ (РВ) в культуральном фильтрате определяли по Хагедорну-Йенсену [9]. Качественный состав редуцирующих сахаров – при помощи HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Предварительно в образцах проводили осаждение белковых веществ и жиров [17].

Удельную активность ферментов выражали в ед/мг белка, который определяли по методу Лоури [25].

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с программами *Microsoft Excel 2003* и *GraphPadInstat*.

Результаты и их обсуждение. Известно, что целлюлоза является индуктором образования целлюлозолитических ферментов микроорганизмов, однако процесс их биосинтеза в значительной мере зависит от типа субстрата, продолжительности культивирования и индивидуальных особенностей штамма [27, 12].

При исследовании активности комплекса целлюлозолитических ферментов у микроскопических грибов в процессе их культивирования на природных целлюлозосодержащих субстратах показано, что ЦА исследованных штаммов находилась в пределах от 0,088 до 2 ед/мл.

При росте микромицетов на среде с ФБ в качестве единственного источника углерода у штаммов *F. oxysporum* количество РВ в культуральном фильтрате и ЦА возрастали с увеличением периода культивирования (рис. 1, 5). По данным литературы такая зависимость объясняется тем, что у разных видов и штаммов *Fusarium* максимальное количество РВ в культуральном фильтрате отмечается на 5–9-е сутки культивирования [3]. Такая же закономерность была обнаружена нами и для *F. flavipes* штаммов 38 и 40. Исключением были штаммы *F. flavipes* 473 и *F. flavipes* 655, у которых ЦА и содержание РВ было максимальным на 6-е сутки культивирования (рис. 2, 6). Согласно данным литературы, содержание РВ в культуральном фильтрате *Aspergillus ochraceus* при выращивании на среде с ФБ в качестве единственного источника углерода на 7-е сутки культивирования было в пределах 0,25–0,3 мг/мл, тогда как у исследованных нами штаммов *F. flavipes* этот показатель варьировал в пределах 0,09 мг/мл – 0,192 мг/мл [4].

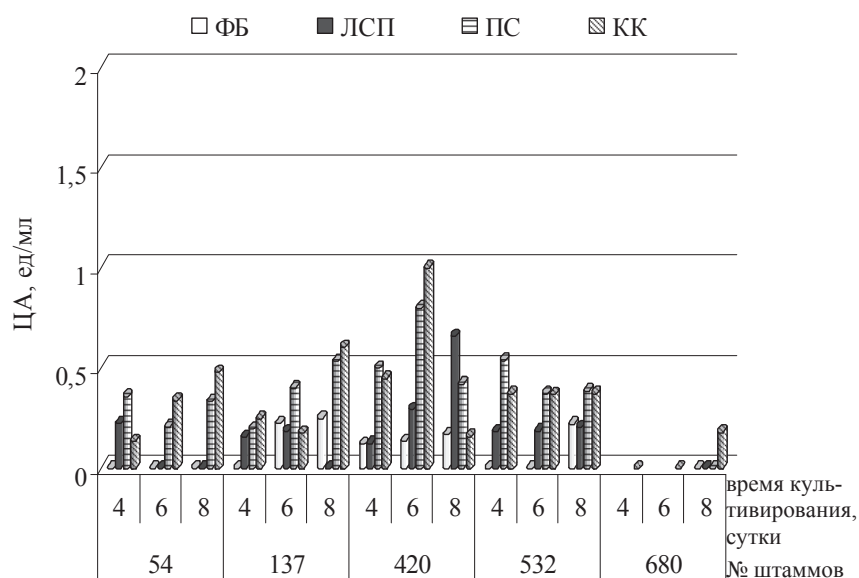


Рис. 1. Целлюлозолитическая активность штаммов *F. oxysporum*.

На средах, где в качестве источника углерода использовались природные субстраты, ЦА штаммов *F. flavipes* была выше, чем у *F. oxysporum* (рис 1, 2), однако, в культуральном фильтрате штаммов *F. oxysporum* содержание РВ было выше (рис. 5, 6).

В результате проведенных исследований обнаружен наиболее активный штамм *F. flavipes* 655, у которого уже на 4-е сутки культивирования на средах с ПС и КК активность целлюлозолитических ферментов составляла 2 ед/мл и 1,6 ед/мл соответственно, а на среде с ЛСП – 0,8 ед/мл. У остальных штаммов максимум активности целлюлаз отмечался на 6-е сутки культивирования. У *F. flavipes* 40 на среде с ЛСП и КК максимальная ферментативная активность была зарегистрирована на 8-е сутки культивирования. Полученные нами данные согласуются с данными литературы [14]. Так, у штаммов *Aspergillus* sp. целлюлозолитическая активность на среде с измельченными кукурузными кочерыжками на 5-е сутки культивирования составляла 1,15 ед/мл.

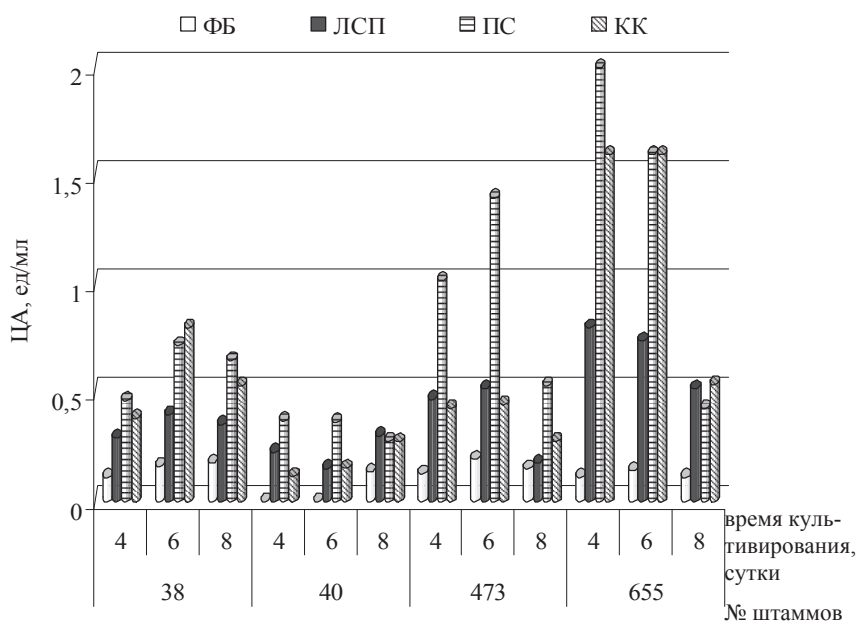


Рис. 2. Целлюлозолитическая активность штаммов *F. flavipes*.

Зависимость активности ферментов целлюлозного комплекса от типа целлюлозосодержащего субстрата и штамма микроскопического гриба была более выраженной у штаммов *F. oxysporum* (рис. 1). Так, максимум целлюлозолитической активности на средах с ПС и КК наблюдали у *F. oxysporum* 420 на 6-е сутки культивирования – 0,8 ед/мл и 1 ед/мл соответственно. У *F. oxysporum* 680 ЦА на средах с ЛСП и ПС на 4-е и 6-е сутки отсутствовала и только на 8-е сутки она была обнаружена в следовых количествах. Однако, на среде с КК активность ферментов целлюлозолитического комплекса этого штамма возрастала с увеличением продолжительности культивирования и на 8-е сутки составляла 0,18 ед/мл (рис. 1). Полученные нами данные иллюстрируют более высокую активность, чем это отмечалось ранее другими исследователями, ЦА у штамов *F. solani* на среде с ПС достигала 1,1 ед/мл на 7-е сутки культивирования [1].

Было показано, что удельная активность целлюлозолитических ферментов штаммов *F. oxysporum* и *F. flavipes* коррелировала с ЦА и составляла 0,025 – 7,03 ед/мг белка (рис. 3, 4).

Наши исследования показали, что количества РВ в культуральном фильтрате микроскопических грибов при их культивировании на растительных отходах зависели от субстрата и штамма микроскопического гриба. Следует отметить, что контрольные образцы с растительными субстратами также содержали РВ вследствие их частичного гидролиза при стерилизации. В контроле на среде с ЛСП было обнаружено 0,17–0,21 мг/мл РВ, на среде с ПС – 0,566–0,575 мг/мл, а на средах с КК – 0,205–0,315 мг/мл.

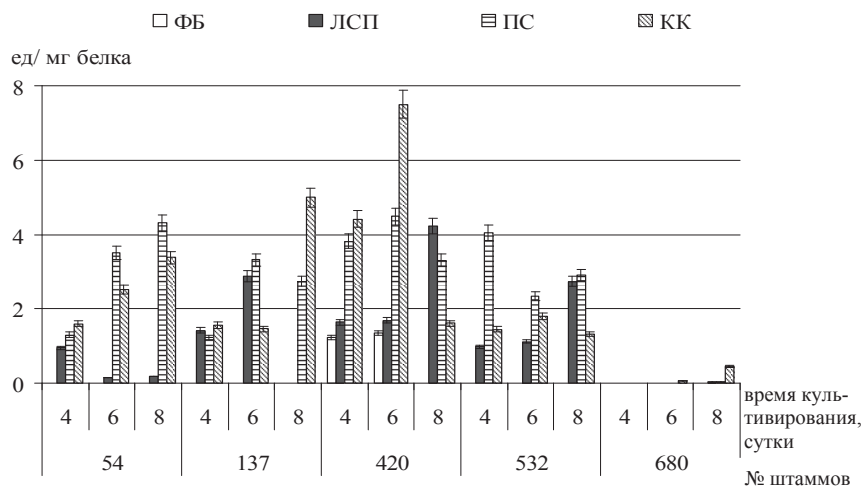


Рис. 3. Удельная активность целлюлозолитических ферментов штаммов *F. oxysporum*.

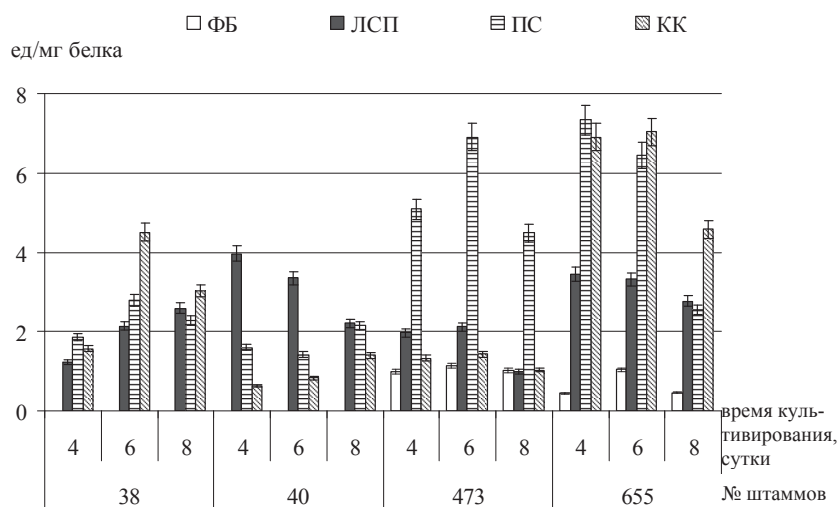


Рис. 4. Удельная активность целлюлозолитических ферментов штаммов *F. flavipes*.

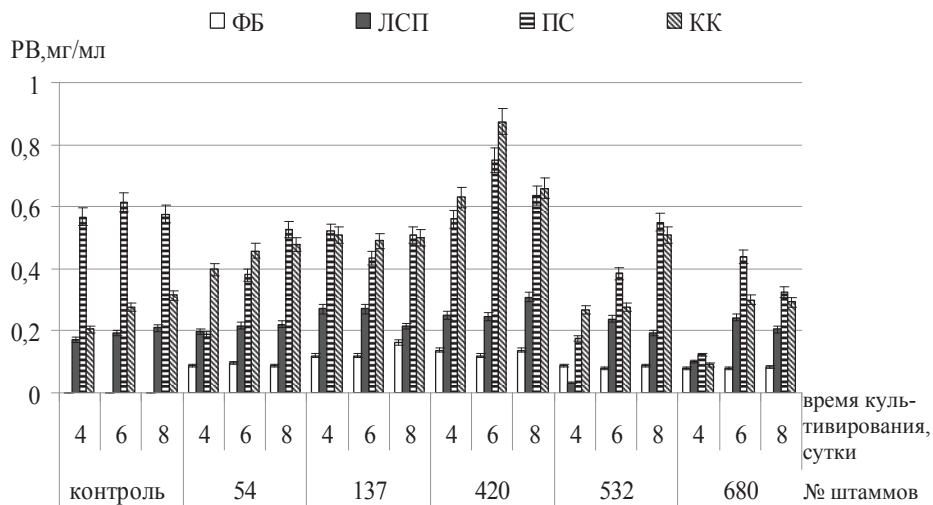


Рис. 5. Содержание редуцирующих веществ штаммов *F. oxysporum*.

У штаммов *F. oxysporum* при росте на средах с ЛСП и КК содержание РВ в культуральном фильтрате были выше, чем в контрольных образцах. Исключение составлял *F. oxysporum* 680, у которого на среде с КК на 4-е сутки культивирования содержание РВ было ниже, чем в контроле на 56 %, а на 8-е – на 8 %. При культивировании штаммов *F. oxysporum* на среде с ПС содержание РВ было ниже, чем в контрольных образцах, за исключением *F. oxysporum* 420, у которого на 6-е и 8-е сутки содержание РВ было выше по сравнению с контролем на 21 % и 23 % соответственно (рис. 5). Снижение содержания РВ, по сравнению с контрольными значениями, при росте микроскопических грибов на средах с растительными отходами может свидетельствовать о способности к их утилизации в процессе роста. У штаммов *F. flavipes* на среде с ЛСП на 6-е и 8-е сутки культивирования содержание РВ было выше, чем в контрольных образцах (рис. 6). Однако на средах, где в качестве источника углерода использовалась ПС и КК, содержание РВ, по сравнению с контролем, снижалось (рис. 6).

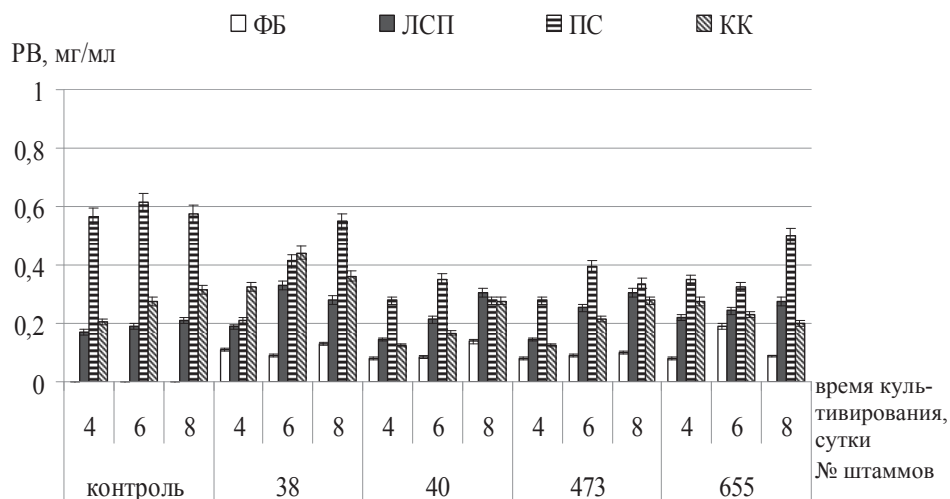


Рис. 6. Содержание редуцирующих веществ штаммов *F. flavipes*.

При изучении качественного состава РВ *F. oxysporum* и *F. flavipes* на 4-е, 6-е и 8-е сутки культивирования были определены глюкоза, целлотетроза, мальтоза, мальтотриоза и фруктоза, что может свидетельствовать о процессах гидролиза субстрата. В контрольных образцах с ФБ редуцирующих сахаров не было обнаружено, в то время как на средах, где источником углерода были растительные отходы, в контрольных образцах обнаружено следовое содержание РВ. Так, на средах с ФБ у всех изученных штаммов обнаружено преобладание целлотетрозы и мальтотриозы, а на средах с природными субстратами – глюкозы, мальтозы и в незначительных количествах мальтотриозы.

В ходе работы было показано, что активность комплекса целлюлозолитических ферментов изученных микроскопических грибов и содержание РВ взаимосвязаны. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов – глюкоза, которая является продуктом ферментативного гидролиза субстрата, может быть репрессором активности целлюлозолитических ферментов [19, 27, 2, 10].

Гидролиз лигноцеллюлозных субстратов – сложный процесс, поскольку лигнин, который содержится в структуре целлюлозных фибрилл, является физическим барьером, а это усложняет процесс доступности субстратов для ферментов. Зависимость ферментативной активности грибов от типа субстрата можно объяснить химическим составом последних. По разным данным [7] состав лигноцеллюлозного комплекса природных субстратов варьирует: в шелухе семян подсолнуха содержится 27 % целлюлозы, 21,5 % гемицеллюлозы, 27,4 % лигнина; в пшеничной соломе – 39 % целлюлозы, 23,4 % гемицеллюлозы, 24,5 % лигнина; а в кукурузных кочерыжках – 33,5 % целлюлозы, 37,7 % гемицеллюлозы и 15,1 % лигнина.

По способности проявлять целлюлозолитическую активность все исследованные штаммы *F. flavipes* и *F. oxysporum* условно можно разделить на три группы:

- целлюлозолитическая активность которых менее 0,1 ед/мл;
- ЦА которых была в пределах 0,1 – 1,0 ед/мл;
- ЦА которых больше 1,0 ед/мл.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что все изученные штаммы микроскопических грибов видов *F. flavipes* и *F. oxysporum* способны гидролизировать ряд природных целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства. Так, целлюлозолитическая активность штаммов *F. flavipes* была максимальной на среде с ПС и составляла 0,368 – 2 ед/мл, у штаммов *F. oxysporum* – на среде с КК 0,136 – 1 ед/мл. При выращивании штаммов микроскопических грибов на растительных отходах в качестве единственного источника углерода нами был отобран штамм *F. flavipes* 655, который проявляет высокую активность комплекса целлюлозолитических ферментов уже на 4-е сутки культивирования – 2 ед/мл на среде с ПС, что является перспективным в биотехнологических процессах ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных субстратов. Штамм *F. oxysporum* 420 гидролизует измельченные КК с образованием 0,875 мг/мл РВ и, следовательно, в дальнейшем может быть использован для получения альтернативных источников энергии.

Т.П. Чепчак, С.В. Олішевська, І.М. Курченко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна*

ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *FENELLIA FLAVIPES* ТА *FUSARIUM OXYSPORUM*

Резюме

Досліджено активність ферментів целюлозолітичного комплексу у штамів *Fenellia flavipes* і *Fusarium oxysporum* при глибинному культивуванні на середовищі, що містило різні рослинні відходи як єдине джерело вуглецю. Показано, що майже всі штами досліджених видів грибів здатні гідролізувати такі целюлозовмісні субстрати, як фільтрувальний папір, лущиння соняшникового насіння, пшеничну

солому та качани кукурудзи. Така здатність залежала від штаму мікроскопічного гриба, типу субстрату і терміну культивування. Відібрано два найбільш перспективні штами: *F. flavipes* 655 з максимумом целюлолітичної активності 2 од/мл на середовищі з пшеничною соломкою та 1,6 од/мл на середовищі з подрібненими качанами кукурудзи на 4-ту добу культивування, а також штам *F. oxysporum* 420, який в процесі гідролізу качанів кукурудзи утворював 0,875 мг/мл редукуючих речовин.

Ключові слова: мікроскопічні гриби, целюлолітична активність, редукуючі речовини, рослинні залишки.

T.P. Chepchak, S.V. Olishavska, I.N. Kurchenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

CELLULOLYTIC ACTIVITY OF *FENELLIA FLAVIPES* AND *FUSARIUM OXYSPORUM* STRAINS

S u m m a r y

The production of cellulolytic enzymes by *Fenellia flavipes* and *Fusarium oxysporum* strains in submerged culture with plant residues as carbon source was studied. It was established that the majority of studied strains was able to hydrolyze the filter paper, husk of sunflower seeds, wheat straw and corn stalks. The ability to synthesize enzymes depended on the strain of microscopic fungi, type of substrate and duration of cultivation. As a result two fungal strains were selected: *F. flavipes* 655 with maximum of cellulolytic activity 2 U/ml in the medium with wheat straw and 1.6 U/ml in the medium with corn stalks on the 4th day of cultivation and *F. oxysporum* 420 which synthesized 0.875 mg/ml of reducing sugars.

The paper is presented in Russian.

Key words: microscopic fungi, cellulolytic activity, reducing substances, plant residues.

The author's address: *Chepchak T.P.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Афанасьева М.М., Кадыров Р.М.* Подбор целлюлозо- и лигнинразрушающих грибов для применения их в системе искусственного замкнутого экологического цикла // Физиология и биохимия грибов. – 1980. – **14**, № 5. – С.410–416.
2. *Билай В.Й.* Целюлази грибів і деякі аспекти їх застосування // Вісник АН УРСР. – 1971. – № 6. – С.45–49.
3. *Билай В.И.* Фузарии. Киев: Наук. думка, 1977. – 442 с.
4. *Билай В.И., Билай Т.И., Мусич Е.Г.* Трансформация целлюлозы грибами. – Киев: Наук. думка, 1982. – 296 с.
5. *Борохова О.Э., Мезенцев Б.М., Орловская Т.В., Михайлова Н.П., Яковлев В.И.* Рост мицелиальных целлюлозразрушающих грибов *Aspergillus terreus* Thom и *Trichoderma koningii* Oud. в глубинной культуре // Микол. и фитопатол. – 1991. – **25**, № 4. – С. 305–308.
6. *Варнайте Р.Н., Раудонене В.З.* Биодegradация растительных отходов микромицетами // Микол. и фитопатол. – 2003. – **37**, № 2. – С. 49–52.
7. *Грачева И. М., Кривова А. Ю.* Технология ферментных препаратов / 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
8. *Жданова Н.М., Олішевська С.В., Василевська А.І., Айзенберг В.Л., Курченко І.М., Артишкова Л.В., Наконечна Л.Т., Капічон Г.П.* Скринінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат // Мікробіол. і біотехнол. – 2008. – № 3(4). – С. 58–63.
9. *Захарова И.Я., Косенко Л.В.* Методы изучения микробных полисахаридов. – Киев: Наук. думка, 1983. – 189 с.
10. *Клесов А.А., Рабинович М.Л., Синицын А.П., Чурилова И.В., Григораш С.Ю.* Ферментативный гидролиз целлюлозы. I. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников // Биоорганическая химия. – 1980. – **6**, № 8. – С. 1225–1242.
11. *Ларченко К.А., Морган Б.В.* Біоетанол як альтернативне поновлюване джерело енергії // Біотехнологія. – 2008. – **1**, № 4. – С. 18–28.

12. Лобанок А.Г. Микробный синтез на основе целлюлозы. – Минск: Наука и техника, 1988. – 261 с.
13. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
14. Назаренко А.В., Соколов В.Н., Гинак А.И., Остпер Б.С. Биосинтез белка и ферментов целлюлолитического комплекса микромицетом *Aspergillus* sp. на кукурузной кочерыжке // Прикл. Биохим. Микробиол. – 1993. – 29, № 3. – С. 437–441.
15. Польшалина Г.В., Чердиченко В.С., Римарёва Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.
16. Рабинович М.Л. Производство этанола из целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикл. Биохим. Микробиол. – 2006. – 42, №1. – С. 5–32.
17. Рухлядева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 216 с.
18. Семенов В. Г. Состояние и перспективы развития производства и применения в Украине экологически чистого биодизельного топлива // 4-я Международная конференция “Сотрудничество для решения проблемы отходов” (Харьков, 31 января – 1 февраля 2007 г.) – Харьков, 2007.
19. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. Учеб. пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
20. Coughlan M. Cellulases: production, properties and applications // Biochem. Soc. Trans. – 1985. – V.13, part 2. – P. 405–406.
21. Fadel M. Production physiology of cellulases and β -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid-state fermentation conditions // J. Biol. Sci. – 2000. – 1, N 5. – P. 401–411.
22. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // Pure Appl. Chem. – 1987. – 59, N 2. – P. 257–268.
23. Gomes I., Shaheen M., Rahman S. R., Gomes D.J. Comparative studies on production of cell wall-degrading hydrolases by *Trichoderma reesei* and *T. viride* in submerged and solid-state cultivations // Bangladesh J. Microbiol. – 2006. – 23, N 2. – P. 149–155.
24. Levy I., Shani Z., Shoseyov O. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains // Biomolecular Engineering. – 2002. – 19, N 1. – P. 17–30.
25. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265 – 275.
26. Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // Curr. Opin. in Biotechnol. – 2005. – 16, N 5. – P. 577–583.
27. Suto M., Tomita F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi // J. Biosci. Bioeng. – 2001. – 92, N 4. – P. 305–311.
28. Tengerdy R. P., Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation // Biochem. Engineer. J. – 2003. – 13, N 2–3. – P. 169–179.

Отримано 13.09.2012