

Т.П. Чепчак, И.Н. Курченко, Е.М. Юрьева

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

БИОДЕГРАДАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА *FUSARIUM OXYSPORUM*

*Изучена целлюлозолитическая и эндогликаназная активность штаммов *Fusarium oxysporum*, выделенных из почв и растений, на средах с растительными отходами в качестве единственного источника углерода. Показано, что большинство исследованных штаммов способны гидролизовать лузгу семян подсолнуха, пшеничную солому, кукурузные кочерыжки. Целлюлозолитическая активность зависела от штамма гриба, типа субстрата и продолжительности культивирования. Максимальная целлюлазная активность – 1 ед/мл и содержание редуцирующих веществ – 0,875 мг/мл обнаружены у почвенного штамма *F. oxysporum* 420 на среде с кукурузными кочерыжками.*

Эндогликаназная активность фитопатогенных штаммов была выше, чем почвенных.

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

Огромное количество целлюлозосодержащих растительных отходов сельского хозяйства утилизируется путем сжигания, что создает неблагоприятную экологическую обстановку. В то же время, такие отходы содержат высокий процент целлюлозы и являются потенциальным источником для решения многих хозяйственных вопросов, в том числе и энергетических.

В последние годы приобрел актуальность поиск новых альтернативных источников энергии, поэтому получение биотоплива и различных химических веществ из растительного сырья является одной из основных задач биотехнологии.

Известно, что в природных условиях микромицеты играют одну из главных ролей в биодеградации растительных отходов [2, 3, 15] за счет наличия комплекса целлюлозолитических ферментов. Особая роль в этом процессе принадлежит представителям родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Chaetomium* и др. [10, 11, 13].

С учетом изложенного, целью нашей работы было изучение активности ферментов целлюлозолитического комплекса у штаммов *Fusarium oxysporum* при их культивировании на различных растительных отходах сельского хозяйства.

Материалы и методы. *Объекты исследований.* В работе использовали 10 штаммов *F. oxysporum* из коллекции культур микроскопических грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Изученные штаммы были выделены из различных типов почв и растений (табл. 1).

В работе использовали 14-суточные культуры, выращенные в пробирках на сусло-агаре при 25±2°C.

Определение общей целлюлозолитической активности проводили в несколько этапов. На первом этапе целлюлозолитическую активность определяли согласно метода, разработанного в лаборатории физиологии грибов Института ботаники Регенсбургского университета (Германия) [17;18], который основан на окрашивании нерасщепленной грибными целлюлазами соли Na –карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) 0,2% раствором конго красного. О ферментативной активности судили на основании диаметра зон просветления вокруг колонии.

Для этого грибы выращивали на пептон-дрожжевом агаре (пептон – 2,5 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, раствор Na-КМЦ– 0,5 %, в качестве источника углерода) в течение 5 суток в чашках Петри при 25±2°C. Учет зон просветления среды проводили на 3-е, 4-е и 5-е сутки культивирования [17;18].

На следующем этапе количественное определение общей целлюлазной активности проводили согласно метода, который основан на связывании динитросалициловой кислоты с редуцирующими сахарами, образующимися в процессе гидролиза субстрата под действием комплекса целлюлаз микромицетов [12]. По данным литературы, максимум целлюлазной ак-

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

тивности приходится на 4–8 сутки, поэтому ферментативную активность определяли на 4-е, 6-е и 8-е сутки культивирования грибов при температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$, в динамических условиях (обороты качалки 220 об/мин), на жидкой минеральной среде Чапека [4]. В качестве единственного источника углерода использовали: лузгу семян подсолнуха (ЛСП), пшеничную солому (ПС), кукурузные кочерыжки (КК), а также фильтровальную бумагу (ФБ) (марка Ф, плотность 75 г/мг, содержащую около 90,0 % целлюлозы) [4, 8]. Измельченные субстраты добавляли в количестве 2 % к объему среды. В питательную среду с субстратами вносили суспензию грибов (2×10^6 конидий) в количестве 5 % к объему среды [8]. Контролем служила среда Чапека с соответствующим субстратом, но без внесения суспензии грибов. Все исследования проведены в 3-х кратной повторяемости.

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *F. oxysporum*

№ штаммов	Место выделения
54	почва заповедника “Мамай гора”, Запорожская обл.
137	чернозем, хутор Картамыш, Луганская обл.
420	почва на расстоянии 200 м от завода Артемовск, Донецкая обл.
532	каштановая почва заповедника “Ольвия”, Николаевская обл.
680	каштановая почва заповедника “Ольвия”, Николаевская обл.
00113	корень гвоздики, Житомирская обл.
00114	корень герберы, Житомирская обл.
50598	клубень картофеля, Житомирская обл.
50603	клубень картофеля, Житомирская обл.
50656	зерно пшеницы, Житомирская обл.

За единицу общей целлюлазной активности 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 . Целлюлозолитическую активность выражали в единицах на 1 мл культурального фильтрата [12].

Определение эндоглюканазной активности осуществляли вискозиметрическим методом с учетом снижения вязкости 0,3 % раствора Na-КМЦ [8, 9, 16].

Степень гидролиза субстрата определяли по формуле:

$$B = ((T_k - T_d) : 100\%) / T_k, \text{ где}$$

B – снижение вязкости, %;

T_d – время вытекания исследуемого раствора, мин;

T_k – время вытекания контрольного раствора, мин.

Активными считали те штаммы микроскопических грибов, культуральный фильтрат которых снижал вязкость раствора Na-КМЦ более чем на 30 %.

Содержание редуцирующих веществ (РВ) в культуральном фильтрате определяли методом Хагедорна-Йенсена [5].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ *Microsoft Excel_2003* и *GraphPadInstat*.

Результаты и их обсуждение. Исследование способности штаммов *F. oxysporum* гидролизовать растворимую Na-КМЦ показало, что все они, вне зависимости от местообитания, проявляли целлюлазную активность. Размеры зон гидролиза варьировали в пределах 0,5–2,3 мм (рис. 1).

Максимальная зона просветления была зарегистрирована у фитопатогенного штамма *F. oxysporum* 50656 – 2,3 мм, а минимальная у почвенного *F. oxysporum* 532 – 0,5 мм (рис. 2). Полученные данные согласуются с данными других авторов [14]. Ранее было показано, что штаммы *F. oxysporum*, выделенные из инфицированных растений пшеницы, а также из ризосферы растений и почвы, имели зоны просветления Na-КМЦ 0 – 11 мм, тогда как штаммы *F. oxysporum*, изолированные из почв и зерновых культур, проявляли более низкую активность (зоны гидролиза Na-КМЦ 0,5 – 2,00 мм) [6].

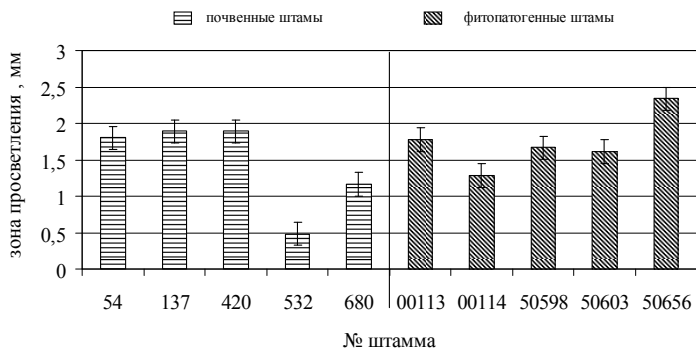


Рис. 1. Величина зон гидролиза Na-КМЦ штаммами *F. oxysporum*.

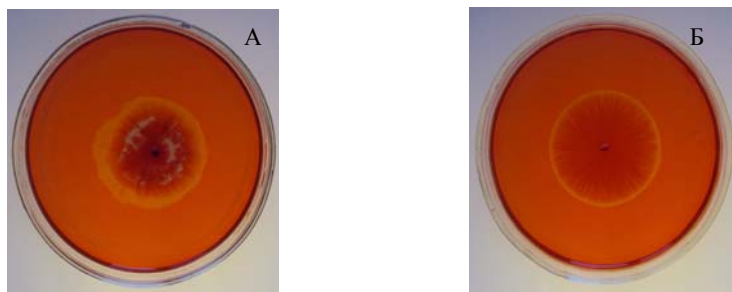


Рис.2. Величина зон гидролиза Na-КМЦ у исследуемых штаммов *F. oxysporum*:
А – 50656, Б – 532.

Целлюлозолитическая активность *F. oxysporum* при их культивировании на растительных целлюлозосодержащих субстратах зависела от типа субстрата, продолжительности культивирования, а также штамма гриба и находилась в пределах 0,06 – 1 ед/мл (рис. 3), тогда как при выращивании *F. oxysporum* на среде с фильтровальной бумагой, получен результат 0,001 – 0,034 ед/мл [19].

Максимальный уровень целлюлазной активности был обнаружен у почвенного штамма *F. oxysporum* 420 – 1 ед/мл на 6-е сутки культивирования на среде с КК.

В ходе исследований было показано, что общая целлюлазная активность штаммов, выделенных из почв, была выше, чем фитопатогенных (рис. 3). Ранее другими исследователями было обнаружено, что целлюлазная активность штаммов *F. solani* на среде с ПС достигала 1,1 ед/мл на 7-е сутки культивирования [1].

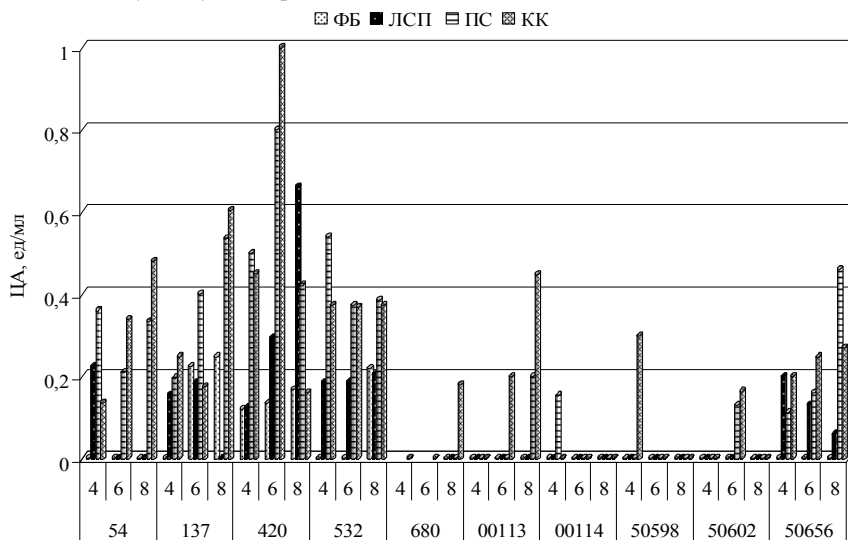


Рис. 3. Целлюлозолитическая активность штаммов *F. oxysporum*.

Максимальная эндоглюканазная активность у большинства исследуемых штаммов отмечалась на 4-е и 6-е сутки культивирования (рис. 4).

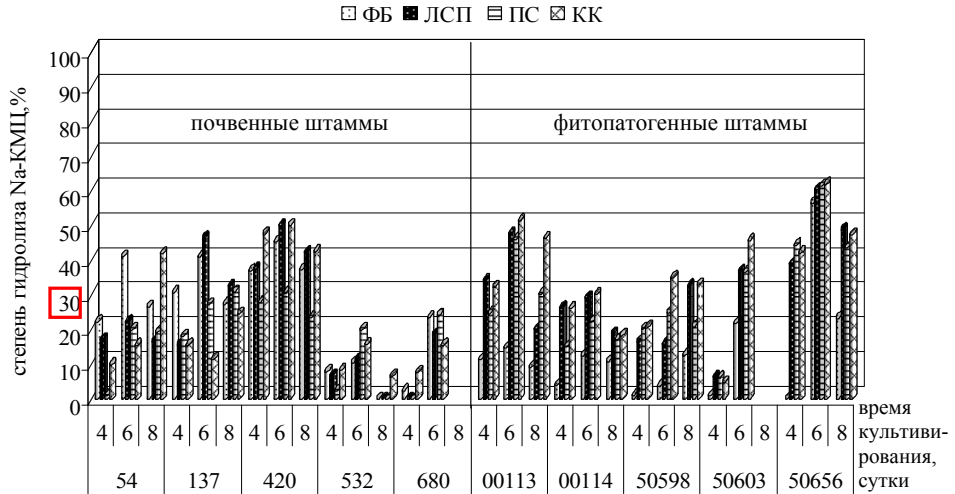


Рис. 4. Эндоглюканазная активность штаммов *F. oxysporum*.

В ходе исследований было показано, что степень гидролиза Na-КМЦ культуральным фильтратом почвенных штаммов *F. oxysporum* была ниже, чем фитопатогенных. Так, максимальную эндоглюканазную активность проявляли почвенный штамм *F. oxysporum* 420 (степень снижения вязкости Na-КМЦ – 30–50 % на средах с ФБ, ЛСП и КК) и фитопатоген *F. oxysporum* 50656 (30–61% соответственно) (рис. 5).

Изучение количественного содержания РВ в культуральной жидкости исследуемых грибов показало, что при культивировании на среде с ФБ и ЛСП содержание РВ превышало контрольные значения, в то время как при выращивании микромицетов на средах с ПС и КК, количество РВ зависело от среды культивирования и штамма гриба (рис. 5).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что все изученные штаммы *F. oxysporum* способны гидролизировать ряд природных целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства. Целлюлолитическая активность зависела от штамма гриба, продолжительности культивирования, субстрата [7, 20] и была максимальной у почвенного штамма *F. oxysporum* 420 – 1ед/мл на среде с КК на 6-е сутки культивирования. Наиболее пригодным для синтеза целлюлаз микромицетами были среды, содержащие КК и ПС.

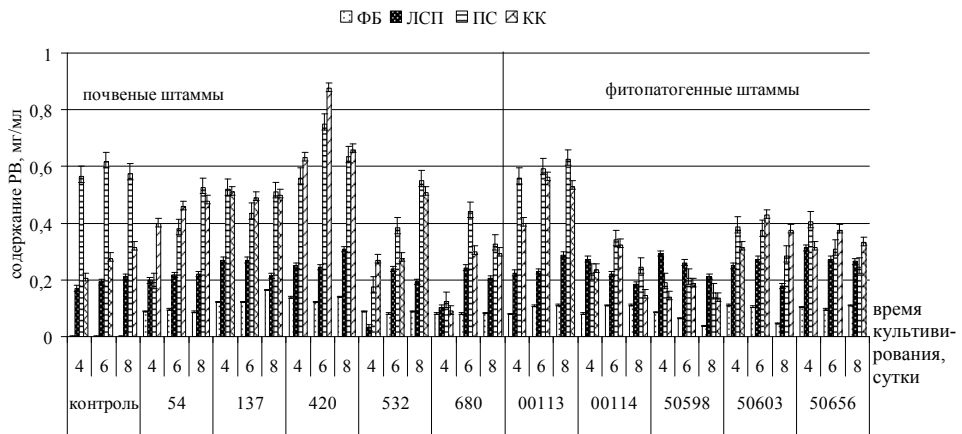


Рис. 5. Содержание редуцирующих веществ в культуральном фильтрате исследуемых штаммов *F. oxysporum*.

Эндоглюканазная активность фитопатогенных штаммов была выше, чем у почвенных. У штаммов *F. oxysporum*, выделенных из растений, максимальную эндоглюканазную активность отмечали на средах с ПС и КК, тогда как у почвенных на средах, содержащих ФБ и ЛСП.

Отобранные в ходе работы штаммы *F. oxysporum* способны образовывать значительные количества РВ, которые в дальнейшем могут быть использованы в биотехнологии для получения альтернативных источников энергии.

Т.П. Чепчак, І.М. Курченко, О.М. Юр'сва

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

БИОДЕГРАДАЦИЯ РОСЛИННИХ ВІДХОДІВ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА *FUSARIUM OXYSPORUM*

Резюме

Досліджено целюлолітичну і ендоглюканазну активність у штамів *Fusarium oxysporum*, виділених із ґрунтів та рослин, при культивуванні на середовищах із рослинними відходами як єдиним джерелом вуглецю. Показано, що більшість досліджених штамів 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. Максимальна целюлазна активність – 1 од/мл і кількість редукуючих речовин – 0,875 мг/мл була виявлена у ґрунтового штаму *F. oxysporum* 420 на середовищі з качанами кукурудзи. Ендоглюканазна активність фітопатогенних штамів була вищою, ніж у ґрунтових штамів.

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

T.P. Chepchak, I.N. Kurchenko, E.M. Yurieva

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

BIODEGRADATION OF PLANT RESIDUES BY *FUSARIUM OXYSPORUM* STRAINS

S u m m a r y

The cellulolytic and endoglucanase activity of *Fusarium oxysporum* strains isolated from soil and plants in the media with plant waste as carbon source has been studied. It was established that the majority of studied strains were able to hydrolyze the filter paper, husk of sunflower seeds, wheat straw and corn stalks. Cellulolytic activity depended on the strain of microscopic fungi, type of substrate and duration of cultivation. The maximum cellulase activity 1 U/ml and the concentration of reducing sugars – 0.875 mg/ml were found in soil strain *F. oxysporum* 420 in the medium with corn stalks.

Endoglucanase activity of plant pathogenic strains was higher than that of soil ones.

The paper is presented in Russian.

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

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.И., Билай Т.И., Мусич Е.Г.* Трансформация целлюлозы грибами. – Киев: Наук. думка, 1982. – 296 с.
3. *Варнайте Р.Н., Раудонене В.З.* Биодegradация растительных отходов микромицетами // Микол. и фитопатол. – 2003. – **37**, N 2. – С. 49–52.
4. *Грачева И. М., Кривова А. Ю.* Технология ферментных препаратов. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: Элевар, 2000. – 512 с.
5. *Захарова И.Я., Косенко Л.В.* Методы изучения микробных полисахаридов. – Киев: Наук. думка, 1983. – 189 с.
6. *Курченко И.Н., Жданова Н.Н., Соколова Е.В.* Изучение наличия некоторых гидролитических и окислительно-восстановительных ферментов у штаммов *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans., изолированных из разных местообитаний // Микробиол. журн. – 2001. – **63**, N 5. – С. 34–43.
7. *Лобанок А.Г.* Микробный синтез на основе целлюлозы. – Минск: Наука и техника, 1988. – 261 с.
8. *Методы экспериментальной микологии:* Справочник / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
9. *Полыналина Г.В., Чередниченко В.С., Римарёва Л.В.* Определение активности ферментов: Справочник. – Москва: ДеЛи Принт, 2003. – 375 с.
10. *Рабинович М.Л.* Производство этанола из целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикл. биохим. микробиол. – 2006. – **42**, N 1. – С. 5–32.
11. *Fadel M.* Production physiology of cellulase and β -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid-state fermentation conditions // J. Biol. Sci. – 2000. – **1**, N 5. – P. 401–411.
12. *Ghose T.K.* Measurement of cellulase activities // Pure Appl. Chem. – 1987. – **59**, N 2. – P. 257–268.
13. *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.
14. *Jahangeer S., Khan N., Jahangeer S., et al.* Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source // Pak. J. Bot. – 2005. – **37**, N 3. – P. 739–748.
15. *Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M.* Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // Curr. Opinion in Biotechnol. – 2005. – **16**, N 5. – P. 577–583.
16. *Manning K.* Improved viscometric assay for cellulase // J. Biochem. Biophys. Methods. – 1981. – **5**, N 4. – P. 189–202.
17. *Molitoris H.P.* Wood degradation, phenoloxidases and chemotaxonomy of higher fungi // Mushroom Sci. – 1978. – **10**, pt. 1. – P. 243–263.
18. *Molitoris H.P., Schaumann K.* Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi // The biology of marine fungi / Ed by S.T. Moss. – Cambridge: Cambridge University Press, 1986. – P. 35–47.
19. *Siham A. Ismail, Sahab A.F., Sawsan S. Darwish.* Factors affecting cellulase and β -glucosidase activities of *Fusarium oxysporum* isolated from old document // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. – 2007. – **2**, N 6. – P. 689–695.
20. *Suto M., Tomita F.* Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi // J. Biosci. Bioeng. – 2001. – **92**, N 4. – P. 305–311.

Отримано 18.09.2013