



УДК 631.466:579.22

Є. П. Копилов

доктор біол. наук, професор
Інституту сільськогосподарської
мікробіології та агропромислового
виробництва НААН

В. П. Патики
доктор біол. наук, професор
Інститут
мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України
secretar@serv.imv.kiev.ua

**О. В. Скуловатов**

аспірант
Інституту сільськогосподарської
мікробіології та агропромислового
виробництва НААН

ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ГРУНТОВОГО ГРИБА *CHAETOMIUM GLOBOSUM*

Анотація. Показано, що природній штам ґрунтового гриба *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr. 377 є активним целюлозолітичним мікроорганізмом. Максимальні показники целюлазної активності гриба були зафіксовані на 14-18 добу культивування. Загальна целюлозолітична активність *C. globosum* 377 складає 0,223, ендоглюканазна – 0,281, екзоглюканазна – 0,252 IU/ml (при культивуванні на середовищі з фільтрувальним папером), β-глюкозидазна активність була вища при культивуванні на пшеничній соломі і становила 0,192 IU/ml. Температура 25-30°C і pH 5,0 поживного середовища є оптимальними для продукування целюлозолітичних ферментів.

Ключові слова: загальна целюлозолітична активність, ендоглюканазна активність, екзоглюканазна активність, β-глюкозидазна активність, *Chaetomium globosum*.

В. Ф. Патики

доктор биологических наук, профессор
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

Е. П. Копылов

доктор биологических наук, профессор
Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН

О.В. Скуловатов

аспирант
Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН

ЦЕЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННОГО ГРИБА *CHAETOMIUM GLOBOSUM*

Аннотация. Показано, что естественный штамм почвенного гриба *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr. 377 является активным целюлозолитическим микроорганизмом. Максимальные показатели целюлазной активности гриба были зафиксированы на 14-18 сутки культивирования. Общая целюлозолитическая активность *C. globosum* 377 составляет 0,223, ендоглюканазная – 0,281, экзоглюканазная – 0,252 IU/ml (при культивировании на среде с фильтровальной бумагой), β-глюкозидазная активность была выше при культивировании на пшеничной соломе и составила 0,192 IU/ml. Температура 25-30 °C и pH 5,0 питательной среды являются оптимальными для выработки целюлозолитических ферментов.

Ключевые слова: общая целюлозолитическая активность, ендоглюканазная активность, экзоглюканазная активность, β-глюкозидазная активность, *Chaetomium globosum*.

V. F. Palyka

Doctor of Biological Sciences
D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Viriology of NAS of Ukraine

E. P. Kopylov

Doctor of Biological Sciences
Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Production NAAS of Ukraine

O. V. Skulovatov

Postgraduate Student
Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Production NAAS of Ukraine

CELLULOLYTIC ACTIVITY OF SOIL FUNGI *CHAETOMIUM GLOBOSUM*

Abstract. The maximum total cellulolytic activity of soil fungi *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr. 377 was 0.223 IU/ml, endoglucanase 0.281 IU/ml, exoglucanase 0.252 IU/ml (when cultivated in an environment with filter paper), p-glucosidase activity was higher when cultivated on wheat straw and amounted to 0.192 IU/ml. Maximum cellulase activity was observed at 14-18 days of cultivation. A temperature of 25-30°C and a pH of 5.0 is an optimal nutrient environment to produce cellulolytic enzymes.

Keywords: total cellulolytic activity, endoglucanase activity, exoglucanase activity, p-glucosidase activity, *Chaetomium globosum*.

Постановка проблеми. Пошук економічно виправданих та ефективних методів утилізації рослинних решток з високим вмістом целюлози – актуальна наукова проблема. Одним з перспективних шляхів її вирішення є використання мікроорганізмів з високою целюлозолітичною активністю.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. За допомогою сучасних біотехнологічних методів, таких як генна інженерія та цілеспрямований мутагенез, вдалося отримати продуценти дуже активних целюлазних ферментних комплексів [5]. Штами, що виділені з природних субстратів, як правило, характеризуються меншою целюлозолітичною активністю, але є більш адаптованими до існування в навколишньому середовищі, потенційно екологічно-безпечними і конкурентоспроможними щодо аборигенної мікрофлори. Вони можуть культивуватися безпосередньо на субстраті, що є технологічно простішим, а отже – економічно дешевшим процесом. Тому пошук нових природних мікроорганізмів деструкторів рослинних решток, залишається актуальним.

Ключова роль у перетворенні целюлози у ґрунті належить мікроскопічним грибам. Особливе місце займають представники роду *Chaetomium* Kunze завдяки їх здатності активно продукувати целюлозолітичні ферменти та високій конкурентоспроможності по відношенню до інших мікроорганізмів. Нами виділено природний штам *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr. 377, який швидко розвивається і активно спорозить на пшеничній соломі [11], а також характеризується стійкістю до зимогенної мікрофлори ґрунту [7].

Метою досліджень представленої роботи є оцінка целюлозолітичної активності зазначеного штаму.

Методика досліджень. Об'єктом дослідження був штам *C. globosum* 377 з колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Зберігається культура *C. globosum* 377 на середовищі сушений агар (4-5% сухих речовин) [4].

Культивували гриб за 26°C на рідкому середовищі Гетчінсона (K_2HPO_4 – 1,0, $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 0,3, $CaCl_2$ – 0,1, $FeSO_4$ – 0,01, $NaCl$ – 0,1, $(NH_4)_2HPO_4$ – 2,0 г/л), де єдиним джерелом вуглецю був фільтрувальний папір (Фільтрак. ГДР) 8,0 г/л або подрібнена (0,3-1,0 см) солома пшениці ярої 25,0 г/л (що за вмістом целюлози еквівалентно 8,0 г/л фільтрувального паперу). Розчином 10% HCl доводили значення рН до 7,0 [4, 11]. Супернатант отримували шляхом центрифугування культуральної рідини (5000 g) 25 хв.

Вимірювання целюлозолітичної активності проводили з інтервалом в чотири дні протягом 3-х тижнів культивування.

Для визначення загальної целюлозолітичної активності до 50 мг фільтрувального паперу («Фільтрак») додавали 1 мл супернатанту, 1 мл 0,05 М натрій-цитратного буфера та інкубували протягом 1 год ($T = 40^\circ C$).

Для визначення екзоглюканазної активності до 50 мг авіцелу (мікрокристалічна целюлоза, «Евалар») додавали 1 мл супернатанту, 1 мл 0,05 М натрій-цитратного буфера та інкубували протягом 1 год ($T = 40^\circ C$).

Ендоглюканазу активність визначали дією фермента на Na-карбоксиметилцелюлазу («Sigma»): 1 мл 0,5%-го розчину Na-КМЦ в 0,05 М натрій-цитратному буфері та 1 мл супернатанту інкубували протягом 30 хв ($T = 40^\circ C$).

Для визначення β -глюкозидазної (целобіазної) активності до 1 мл 0,025%-го розчину целобіози («Merck») в 0,05 М натрій-цитратному буфері додавали 1 мл супернатанту та інкубували протягом 30 хв ($T = 40^\circ C$).

Дослідження проводилось відповідно до методик та рекомендацій IUPAC [6, 10]. Кількість редуруючих цукрів визначали за методом Шомоді-Нельсона в перерахунку на глюкозу [4]. Кількість глюкози для встановлення β -глюкозидазної активності встановлювали глюкозо-пероксидазним методом.

Активність целюлозолітичних ферментів виражали в міжнародних одиницях (IU), які відповідають такій

кількості ферменту, що каталізує утворення 1 мкмоль редуруючих цукрів (або 1 мкмоль глюкози для визначення β -глюкозидазної активності) за 1хв інкубування.

Питома целюлозолітична активність (IU/mg) вказує на загальну целюлозолітичну активність такого об'єму культуральної рідини, де міститься 1 мг протеїну [6, 10]. Концентрація білку в культуральному фільтраті визначалась спектрофотометричним методом (CF-46, Росія) [8]. Водневий показник живильного середовища визначались за допомогою аналізатора іонів AI-123 (Україна).

Визначали вплив реакції середовища на загальну целюлозолітичну активність в діапазоні від 4 до 8 рН, з кроком 0,5, за використання 10%-х розчинів HCl або NaOH.

Для визначення впливу температури на загальну целюлозолітичну активність гриб культивували в термостаті протягом 6 діб за температурі від 15 °C до 35 °C з кроком 5 °C, початкова реакція середовища була нейтральна.

Досліди проводились в 3-кратній повторності, статистичну обробку отриманих результатів здійснювали відповідно до загальноприйнятих методів [2], з використанням програми Microsoft Excel [3].

Основні результати дослідження. Як відомо, активність целюлазного ферментного комплексу мікроорганізму значною мірою залежить від целюлозовмісного субстрату, періоду культивування та фізіологічних особливостей штаму [14].

Найвищі показники екзоглюканазної активності (рис. 1) спостерігались на 18 добу при культивуванні як на фільтрувальному папері, так і на пшеничній соломі, і складали 0,252 та 0,223 IU/ml відповідно.

Можливість активно продукувати екзоглюканазу вказує на високий целюлозолітичний потенціал *C. globosum* 377 і його здатність гідролізувати кристалічні форми целюлози, хоча для більшості грибів характерною є здатність розкладати лише аморфну целюлозу [1].

В більшості випадків ендоглюканаза є найактивнішою складовою ферментного комплексу, вона забезпечує розклад аморфних форм целюлози до целобіози [1]. При культивуванні *C. globosum* 377 на середовищі з фільтрувальним папером максимальна екзоглюканазна активність спостерігалась на 14 добу культивування і становила 0,281 IU/ml, максимум ендоглюканазної активності на пшеничній соломі відзначали на 18 добу – 0,233 IU/ml.

Ендоглюканаза і екзоглюканаза забезпечують первинний етап розкладу целюлози. Одним з продуктів її деградації є целобіоза, яка під дією ферменту β -глюкозидази гідролізується до глюкози. На відміну від ендо- і екзоглюканазної активності, β -глюкозидазна активність *C. globosum* 377 була вища при культивуванні на середовищі з пшеничною соломкою, ніж на фільтрувальному папері. Максимальне значення β -глюкозидазної активності *C. globosum* 377 спостерігалось на 18 добу і становило 0,192 IU/ml. Як відомо з літературних джерел, це явище притаманне для багатьох штамів мікроорганізмів [12].

Інтегральною оцінкою целюлазного комплексу є загальна целюлазна активність. Вона визначається за здатністю ферментного комплексу розкладати фільтрувальний папір. Дані експерименту свідчать, що найвища загальна целюлазна активність *C. globosum* 377 реєструвалась на 14 і 18 добу культивування на фільтрувальному папері, що складало 0,223 і 0,219 IU/ml відповідно, а максимальне значення при вирощуванні на пшеничній соломі становило 0,199 IU/ml.

Питома целюлозолітична активність характеризує загальну целюлозолітичну активність такого об'єму культуральної рідини в якій міститься 1 мг білку. Даний показник *C. globosum* 377 при культивуванні на фільтрувальному папері був вищий, ніж на пшеничній соломі протягом всього періоду росту гриба (рис. 2).

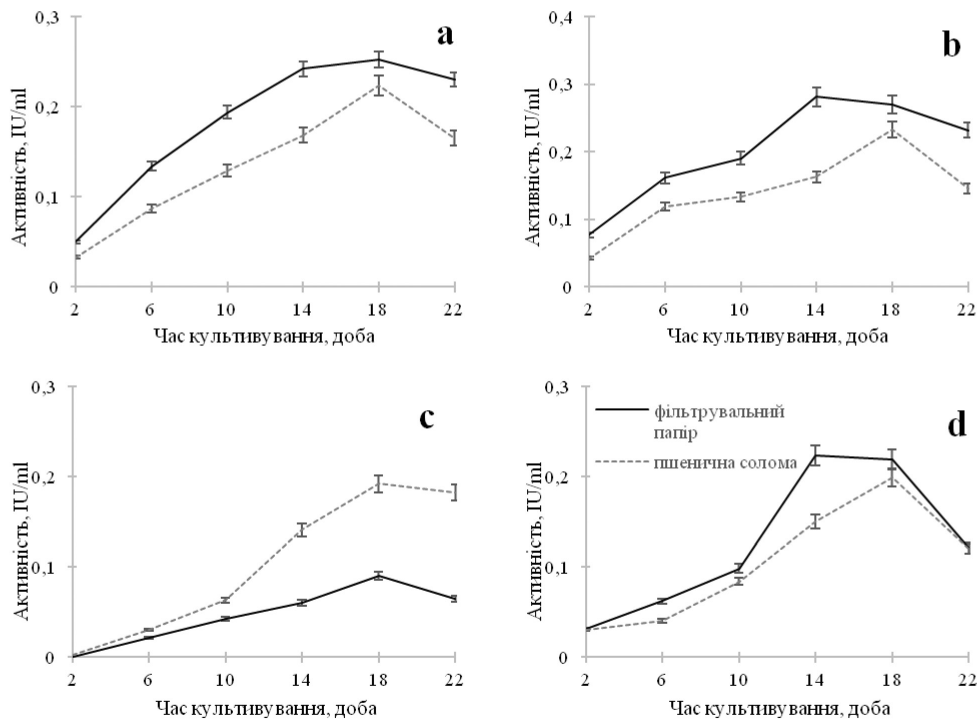


Рис. 1. Динаміка екзоглюканазної (а), ендоглюканазної (б), β -глюкозидазної (с) та загальної целюлазної активності (д) гриба *C. globosum* 377

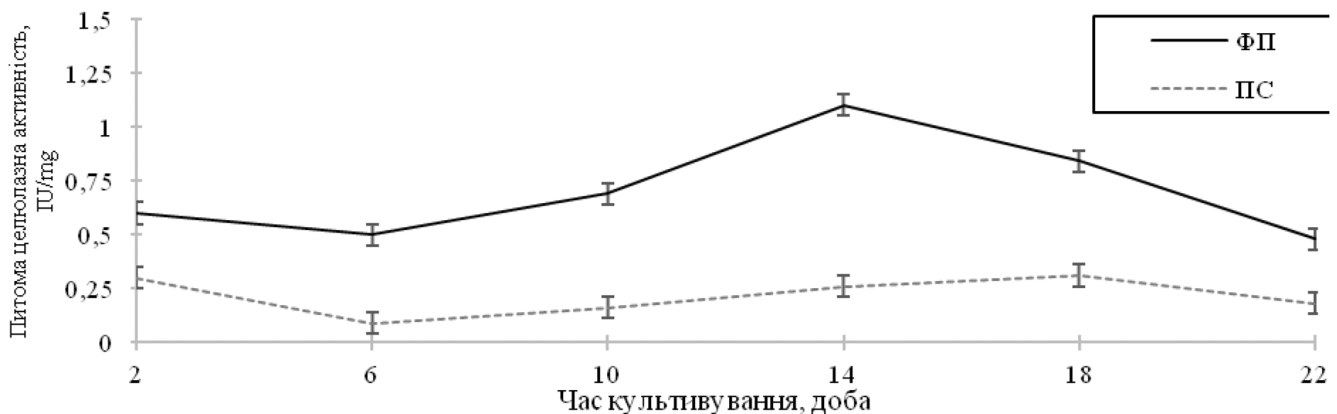


Рис. 2. Динаміка питомої целюлазної активності *C. globosum* 377

Максимальне значення питомої целюлозолітичної активності у варіанті з фільтрувальним папером спостерігалось на 14 добу (1,10 IU/ml), а у варіанті з пшеничною соломою – на 2 і 18 добу культивування.

Важливим критерієм, що дозволяє оцінити можливість практичного застосування мікроорганізму, є вплив температури культивування і рН середовища на активність біосинтезу ним екзоферментів. Раніше нами встановлено, що *C. globosum* 377 може рости на суловому агарі в температурному інтервалі від 14°C до 35°C та при водневому показнику 4,2-11,2 рН, оптимальними значеннями є 25-28°C та 6,4-7,2 рН [11]. Целюлазна активність *C. globosum* 377 зростає зі збільшенням температури від 15°C і досягає оптимуму за 25-30°C (рис. 3, а), що відповідає значенням оптимуму росту. Встановлено, що у лужному середовищі целюлазна активність проявляється слабо і зростає зі збільшенням кислотності (рис. 3, б). Максимальне значення досягається при рН 5,0, нижче значення рН живильного середовища пригнічує дану активність.

Отже, при вирощуванні *C. globosum* 377 на середовищі з фільтрувальним папером спостерігається максимальна ендоглюканазна, екзоглюканазна, питома та загальна целюлазна активності, але на пшеничній соломі вища β -глюкозидазна активність. На обох середовищах максимум целюлазної активності спостерігався на 14-18 добу

культивування.

Аналізуючи літературні дані можемо констатувати, що штам *C. globosum* 377 за целюлозолітичною активністю має певні переваги над відомими представниками роду *Chaetomium* Kunze [9, 11, 12] та може бути використаний як перспективний деструктор рослинних решток з високим вмістом целюлози.

Висновки. Проведеними дослідженнями встановлено, що природний штам ґрунтового гриба *C. globosum* Kunze ex Fr. 377 є активним целюлозолітичним мікроорганізмом. Продукування екзоглюканаз *C. globosum* 377 і здатність гідролізувати кристалічні форми целюлози вказує на його високий целюлозолітичний потенціал. Найвища загальна целюлазна активність *C. globosum* 377 спостерігалась на 14 і 18 добу і складала 0,223 і 0,219 IU/ml, максимальне значення при вирощуванні на пшеничній соломі становило 0,199 IU/ml. Максимальне значення β -глюкозидазної активності *C. globosum* 377 спостерігалось на 18 добу і становило 0,192 IU/ml. Встановлено, що у лужному середовищі целюлазна активність проявляється слабо і зростає зі збільшенням кислотності. Температура 25-30°C і рН 5,0 поживного середовища є оптимальними для продукування целюлозолітичних ферментів. Штам ґрунтового гриба *C. globosum* 377 за целюлозолітичною активністю має переваги над відомими представниками роду *Chaetomium* Kunze та може бути використаний як

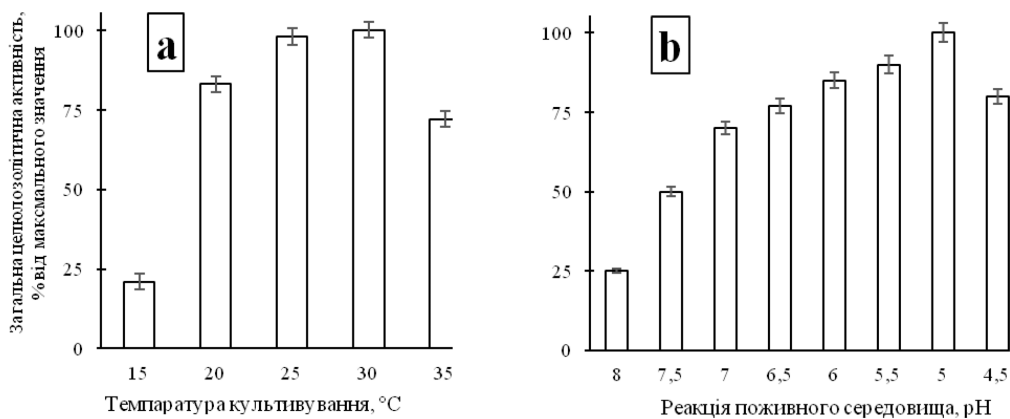


Рис. 3. Вплив температури (а) та рН живильного середовища (б) на загальну целюлозолітичну активності *C. globosum* 377

перспективний деструктор рослинних решток з високим вмістом целюлози.

Література

1. Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно-функціональні особливості // Біотехнологія. – 2009. – Т. 2, № 2. – С. 23–41.
2. Горбач А.Л., Курочкин В.Е., Кноп И.С. Методы статистической обработки экологической информации: дискриминантный, корреляционный и регрессионный анализ. – Санкт-Петербург: СПбГУАП. СПб; РАН. Ин-т аналитич. прибор-я, 2005. – 48 с.
3. Коросов А.В., Горбач В.В. Компьютерная обработка биологических данных. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2016. – 96 с.
4. Методы экспериментальной микологии : справочник / Под ред. В. И. Билай. – Київ.: Наук.думка, 1982. – 549 с.
5. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология – 1993. – Т. 25. – 152 с.
6. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоconversion лигноцеллюлозных материалов: учеб. пособие. – Москва : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
7. Скуловатов О.В. Особливості формування мікробоценозу в ризосфері кукурудзи за впливу гриба-продуцента целюлолітичних ферментів. // Мікробіологія і сучасному сільськогосподарському виробництві. Матеріали Х наукової конференції молодих вчених (22–24 жовтня 2014 р., Чернігів): зб. тез доп. Сівер-Друк. – 2014. – С. 36–42.
8. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум часть 2. Белки. Ферменты. Витамины. – Санкт-Петербург: университет ИТМО, 2015. – 107 с.
9. Eyini M., Babitha S., Min Woong Lee. Cellulose Utilization and Protein Productivity of Some Cellulolytic Fungal Cocultures // Mycobiology. – 2002. – №30. – С. 166–169.
10. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity // Pure and Applied Chemistry – 1987. – Vol. 59, № 2. – P. 257 – 268.
11. Kopilov E.P., Skulovatov O.V. Physiological characteristics of mold producing Cellulolytic enzymes *Chaetomium globosum* 377 // Microbiological aspects of optimization of the production process of cultured crops: proceedings of the International Scientific and Practical Internet Conference (Chernihiv, June 16–18, 2015). – Chernihiv – Nizhyn: Publisher PE Lysenko N.M., 2015. – P. 12.
12. Lakshmikanth, Kamal, Mathur S.N. Cellulolytic activities of *Chaetomium globosum* on different cellulosic substrates // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1990. – №6. – С. 23–26.
13. Soni R., Sandhu D.K., Soni S.K. Localisation and optimisation of cellulase production in *Chaetomium erraticum* // Journal of Biotechnology. – 1999. – №73. – С. 43–51.
14. Suto M. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi // J. Biosci. Bioeng. – 2001. – 92, N 4. – P. 305–311.

References

1. Borzov N.V., Varbanets L.D. Tselulozodehradyuyuchi system microorganisms, biosynthesis, properties and structural and functional features. Biotechnology, 2009, Vol 2, no 2, 23–41 pp. (in Ukrainian).
2. Gorbach A.L., Kurochkin V.E., Knoop I.S. Methods of statistical processing of environmental information: discriminant, correlation and regression analysis. St. Petersburg: SPbSUAI. St. Petersburg; Russian Academy of Sciences. Inst analytic. approx th, 2005. 48 p. (in Russian).
3. Korosov A.V., Gorbach V.V. Computer processing of biological data. Petrozavodsk: Petrozavodsk State University, 2016. 96 p. (in Russian).
4. Methods of Experimental Mycology: Handbook. Kyiv: Nauk.dumka, 1982. 549 p. (in Ukrainian).
5. Sinitsyn A.P., Chernoglazov V.M., Gusakov A.V. Methods of studying and properties of cellulolytic enzymes. Results of science and technology. Ser. Biotechnology, 1993, V. 25, pp. 152. (in Russian).
6. Sinitsyn A.P., Gusakov A.V. Chernoglazov V.M. Bioconversion of lignocellulosic materials: Textbook. allowance. Moscow: Moscow University Press, 1995. 224 p. (in Russian).
7. Skulovatov A.V. Features mikrobotsenozu formation in the rhizosphere of maize under the influence of a mushroom-producer cellulolytic enzymes. Microbiology and modern agricultural production. Materials of X scientific conference of young scientists (22–24 October 2014, Chernihiv): Coll. abstract add. Siver-Print, 2014. pp. 36–42. (in Ukrainian).
8. Shleykyn A.G., Skvortsova N.N., Blandov A.N. Biochemistry. Laboratory equipment workshop part 2 protein. Enzymes. Vitamins. St. Petersburg: YTMO University, 2015. 107 p. (in Russian).
9. Eyini M., Babitha S., Min Woong Lee. Cellulose Utilization and Protein Productivity of Some Cellulolytic Fungal Cocultures. Mycobiology, 2002, no.30, pp. 166–169. (in Russian).
10. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity. Pure and Applied Chemistry, 1987, Vol. 59, no. 2, pp. 257–268. (in Ukrainian).
11. Kopilov E.P., Skulovatov O.V. Physiological characteristics of mold producing Cellulolytic enzymes *Chaetomium globosum* 377. Microbiological aspects of optimization of the production process of cultured crops: proceedings of the International Scientific and Practical Internet Conference (Chernihiv, June 16–18, 2015). Chernihiv – Nizhyn: Publisher PE Lysenko N.M., 2015, pp. 12. (in Ukrainian).
12. Lakshmikanth, Kamal, Mathur S.N. Cellulolytic activities of *Chaetomium globosum* on different cellulosic substrates. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1990, no. 6, pp. 23–26. (in Russian).
13. Soni R., Sandhu D.K., Soni S.K. Localisation and optimisation of cellulase production in *Chaetomium erraticum*. Journal of Biotechnology, 1999, no.73. pp. 43–51. (in Chile)
14. Suto M. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. J. Biosci. Bioeng, 2001, 92, no. 4, pp. 305–311.