

**О.М. Юр'єва, І.М. Курченко, С.О. Сирчін, О.С. Харкевич,
А.К. Павличенко, Л.Т. Наконечна**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

ЦЕЛЮЛАЗНА ТА КСИЛАЗНА АКТИВНОСТІ ЕНДОФІТНИХ І ҐРУНТОВИХ ШТАМІВ *PENICILLIUM FUSICULOSUM* THOM

Мета. Провести порівняльне дослідження целюлазної та ксиланазної активностей 16 ендоефітних і ґрунтових штамів *Penicillium funiculosum*. **Методи.** Об'єктами досліджень були 16 ендоефітних і ґрунтових штамів *P. funiculosum* з колекції культур мікроскопічних грибів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Целюлазну та ксиланазну активності визначали за величиною зони ферментативної активності на агаризованих середовищах з розчинними целюлозними (Na-КМЦ) і геміцелюлозними (ксилан) субстратами, розраховували ензиматичний індекс (EI). **Результати.** Усі досліджені штами *P. funiculosum*, незалежно від джерела виділення, здатні гідролізувати Na-КМЦ та буковий ксилан. Вперше для характеристики целюлазної і ксиланазної активностей штамів *P. funiculosum* з різних еконіш розраховано ензиматичний індекс. Встановлено, що целюлазна активність ендоефітних штамів *P. funiculosum* була помірною, у ґрунтових ізолятів – від низької до високої. Ендоефіти проявили низьку та помірну ксиланазну активність, у той час як ґрунтові характеризувались виключно високою активністю. **Висновки.** Встановлено, що ендоефітні та ґрунтові штами *P. funiculosum* здатні гідролізувати Na-КМЦ і буковий ксилан, причому ендоефіти характеризувались помірною целюлазною активністю, а у ґрунтових штамів її рівень був від низького до високого. Ксиланазна активність ендоефітів була низькою, а у ґрунтових ізолятів – виключно високою. Отримані експериментальні дані можуть бути основою для пояснення ендоефітного способу існування *P. funiculosum* в рослині, а також пошуку продуцентів комплексів гідролітичних ферментів для сучасних біотехнологій.

К л ю ч о в і с л о в а: *Penicillium funiculosum*, ендоефіти, сапрофіти, целюлазна і ксиланазна активності, ензиматичний індекс.

Відомо, що види роду *Penicillium* продукують целюлозолітичні ферментні комплекси, причому співвідношення екзо-, ендоглюканазної та β-глюкозидазної активностей видів цього роду є більш збалансованим порівняно з *Trichoderma reesei* [10, 15, 17]. Ґрунтові ізоляти *Penicillium funiculosum* Thom секретують повний комплекс целюлозолітичних ферментів [10, 11], що становить великий потенціал для виробництва ферментних препаратів завдяки підвищеному вмісту β-глюкозидази зокрема [11]. Інформація щодо ендоефітів цього виду практично відсутня [2, 5].

Нашими попередніми дослідженнями показано, що *P. funiculosum* входить до складу комплексу ендоефітів рослин сфагнових боліт Полісся України [2, 5]. Цей вид широко розповсюджений у різноманітних місцезнаваннях – ґрунтах різних типів, у тому числі забруднених радіонуклідами і важкими металами; рослинах та їх рештках, зокрема як деструктор сфагнових мохів; технічних матеріалах та пам'ятках мистецтва [2–4, 7, 9, 13].

P. funiculosum продукує ряд біологічно активних речовин: ферментів (у тому числі позаклітинні целюлази та глюкозооксидазу); стимуляторів росту рослин (гібереліни, індоліл-3-оцтову кислоту) [1, 11, 13, 18]; сполук з антибактеріальною, антифунгальною і протівірусною дією [13].

Незважаючи на більш ніж 100-річний період дослідження ендоефітних грибів, їх екологічне значення та фізіологічні особливості досі лишаються мало вивченими. Ендоефітні гриби існують усередині рослини-хазяїна, не викликаючи при цьому видимих ознак ураження [20, 23]. Ця група грибів сприяє пристосуванню рослинних угруповань до абіотичних і біотичних факторів довкілля. На рівні окремої рослини при такому симбіозі гриб отримує від хазяїна органічні речовини та надає йому елементи мінерального живлення. При мутуалістичних відносинах з рослиною-хазяїном мікроскопічні гриби синтезують комплекс біологічно активних метаболітів, у тому числі ферментів, що трансформують целюлозу і геміцелюлозу [10, 17, 20, 21, 25]. Важливим аспектом дослідження гідроліз ендоефітних грибів є ступінь їх залучення в гідроліз рослинних полімерів. У ендоефітних видів відбувається індукція целюлазної активності особливо на рослинних залишках, що може свідчити про їх участь у процесах трансформації природної целюлози [22]. У науковій літературі практично відсутні відомості щодо порівняльного вивчення гідролітичних ферментів ендоефітних та ґрунтових ізолятів *P. funiculosum*.

Метою роботи було визначення целюлазної і ксиланазної активностей ендоефітних (біотрофів) і ґрунтових (сапротрофів) цього виду.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були 16 ендоефітних і ґрунтових штамів *P. funiculosum* з колекції культур мікроскопічних грибів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (табл. 1).

Культури досліджених грибів культивували протягом 3–10 діб при 26 ± 2 °C [8]. Загальну целюлазну та ксиланазну активності штамів *P. funiculosum* визначали якісним методом на 3, 5, 7 та 10 доби росту [19, 24].

Про інтенсивність целюлазної та ксиланазної активностей судили за величиною зони ферментативної активності, яку визначали як різницю між середнім радіусом зони просвітлення середовища та середнім радіусом колонії гриба. Величина цієї зони, та, відповідно, її ферментативна активність, були розділені нами на три групи: низька – зона ≤ 2 мм; помірна – 2,1–6,9 мм; висока – ≥ 7 мм.

Для оцінки целюлазної і ксиланазної активностей використовували ензиматичний індекс (ЕІ), який розраховували як відношення діаметру зони гідролізу середовища до діаметру колонії гриба [14, 16, 21]. Якщо ензиматичний індекс гриба дорівнює 1,5 або більше, то штам вважають перспективним продуцентом [14]. За отриманими значеннями ЕІ ферментативні активності умовно поділені нами на такі групи: 1,0–1,24 – низька; 1,25–1,49 – помірна; 1,5 і вище – висока активність.

Таблиця 1

Досліджені штами *Penicillium funiculosum*

№ п/п	Штам	Джерело виділення	Місце ізолювання, рік
Ендофітні штами			
1.	16784	Стебло журавлини	Житомирська обл., 1999
2.	16786	Стебло пухівки	
3.	16785	Лист пухівки	
4.	16788	Стебло журавлини	
5.	16795	Лист журавлини	
6.	16787	Лист вовчого тіла	Рівненська обл., 2004
Грунтові штами			
7.	16825	Ризосфера ячменю	Дніпропетровська обл., 1999
8.	16826	Лісовий ґрунт	Київська обл., 1999
9.	16783	Садовий ґрунт	Херсонська обл., 2000
10.	16789	Чорнозем	Дніпропетровська обл., 2006
11.	16790		
12.	16791	Лісовий ґрунт	Житомирська обл., 2000
13.	16792	Чорнозем	Запорізька обл., 2002
14.	16793		
15.	16794		
16.	16874	Лісовий ґрунт	Київська обл., 1990

Статистичну обробку даних проводили з використанням програм STATISTICA 6.0 та Microsoft Excel.

Результати. Встановлено, що всі штами *P. funiculosum*, незалежно від джерела виділення, мали целюлазну та ксиланазну активності. При дослідженні ферментативних активностей за величиною зони просвітлення середовища встановлено, що всі ендофіти *P. funiculosum* характеризувались помірною целюлазною активністю. Грунтові штами виявляли целюлазну активність від низької до високої (табл. 2, рис. 1А). У досліджених штамів

Таблиця 2

Целюлазна (ЦА) і ксиланазна активність (КА) штамів *P. funiculosum*

№ п/п	Штам	Зона активності ферменту, мм		ЕІ	
		ЦА	КА	ЦА	КА
Ендофітні штами					
1.	16784	4,2±0,21	6,8±0,34	1,40±0,10	1,24±0,04
2.	16786	3,0±0,15	7,7±0,36	1,38±0,20	1,21±0,06
3.	16785	4,0±0,19	7,0±0,31	1,29±0,20	1,36±0,04
4.	16788	4,0±0,17	6,7±0,31	1,34±0,30	1,82±0,30
5.	16795	4,7±0,22	6,5±0,32	1,22±0,30	1,27±0,02
6.	16787	4,3±0,18	3,0±0,14	1,51±0,07	1,13±0,05
Грунтові штами					
7.	16825	5,8±0,27	9,7±0,46	1,51±0,06	1,77±0,20
8.	16826	7,0±0,33	10,5±0,48	1,50±0,07	1,56±0,04
9.	16783	5,7±0,25	11,2±0,52	1,23±0,20	1,63±0,08
10.	16789	2,2±0,12	12,7±0,59	1,38±0,08	1,78±0,03
11.	16790	5,8±0,26	10,0±0,48	2,00±0,09	1,69±0,07
12.	16791	1,3±0,07	11,3±0,51	1,36±0,05	2,16±0,04
13.	16792	1,3±0,08	10,2±0,44	1,34±0,08	1,95±0,03
14.	16793	1,2±0,05	10,2±0,48	1,10±0,02	1,75±0,06
15.	16794	2,0±0,11	12,8±0,61	1,19±0,07	1,74±0,03
16.	16874	2,5±0,15	10,0±0,45	1,34±0,10	1,57±0,30

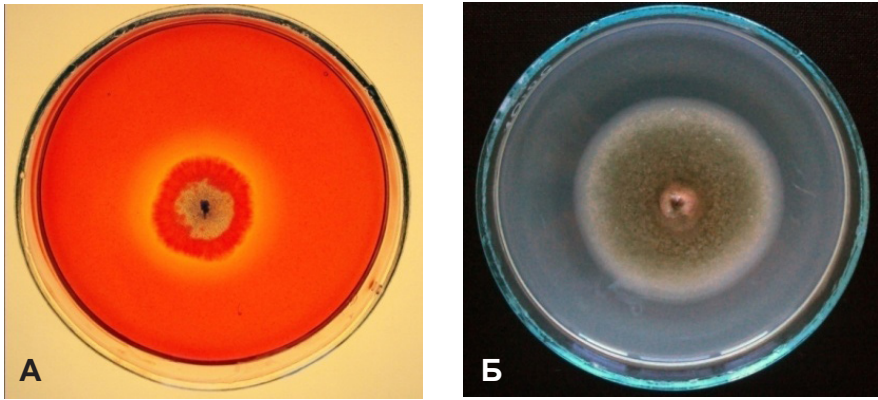


Рис. 1. Целюлазна (А) і ксиланазна (Б) активності *P. funiculosum* 16795

P. funiculosum не встановлено чіткої залежності між тривалістю культивування та целюлазною активністю. Для різних трофічних груп встановлено штамову специфічність целюлазної активності грибів.

Ксиланазна активність ендоефітних штамів *P. funiculosum* характеризувалась, в основному, помірними значеннями, однак ґрунтові – виключно високими (табл. 2, рис. 1Б).

Вперше для характеристики целюлазної і ксиланазної активностей штамів *P. funiculosum* з різних екологічних місць було визначено ензиматичний індекс (ЕІ). Слід зазначити, що всі досліджені штами *P. funiculosum* характеризувались більшими за 1,0 значеннями ЕІ целюлазної і ксиланазної активностей. Ендоефітні штами проявили, в основному, помірну целюлазну активність (66,6 %), ґрунтові мали низьку (30 %), помірну (40 %) і високу (30 %) активність (рис. 2).

Ендоефіти мали низький рівень ксиланазни, тоді як усі ґрунтові ізоляти проявили високу ксиланазну активність. При дослідженні целюлазної і ксиланазної активностей за величиною зони ферментативної активності та визначенні ензиматичного індексу встановлено, що всі досліджені штами *P. funiculosum* здатні гідролізувати вивчені субстрати – Na-КМЦ і буковий ксилан.

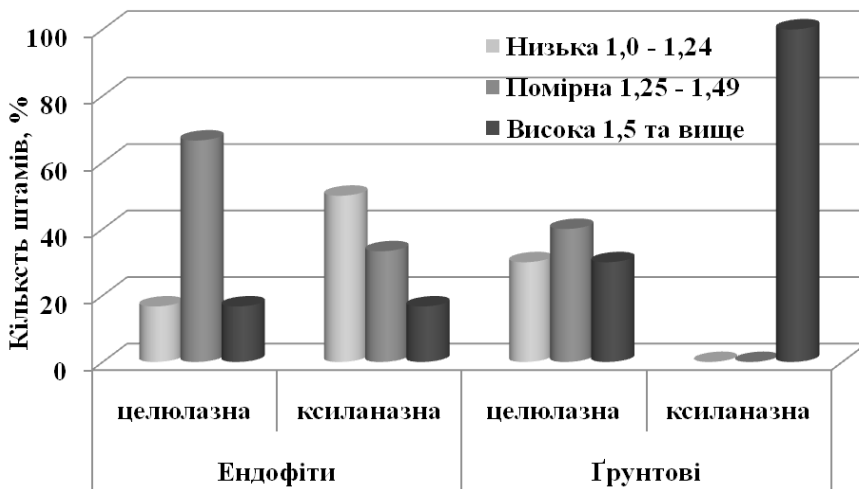


Рис. 2. Ензиматичний індекс целюлазної і ксиланазної активностей штамів *P. funiculosum*

Обговорення. У ендоефітних штамів ширина зон ксиланазної активності становила $0,3 \div 7,7$ мм, у ґрунтових – $3,5 \div 12,8$ мм. Діапазон варіювання зон активності ендоефітних і ґрунтових штамів *P. funiculosum* був більшим, ніж у ґрунтових і фітопатогенних штамів *F. oxysporum* ($1,5 \div 4,5$ мм) [6].

Відомо, що у делеційного мутантного штаму *Trichoderma reesei* RUTC30 ензиматичний індекс складав 2,98 [14]. Із 78 досліджених авторами штамів грибів роду *Trichoderma* лише у 10 ЕІ був вищим і становив $1,5-1,9$. У той же час деякі види *Trichoderma* можуть мати ЕІ, нижчий за 1,0 [12]. Показано, що ЕІ целюлазної активності вищий за 1,5 лише у *Penicillium griseofulvum* і складав 1,61. ЕІ ксиланазної активності був вищим порівняно з ЕІ целюлазної активності, лише *Fusarium oxysporum* та *Aspergillus* sp. мали ЕІ, менший за 1,5. Важливо зазначити, що лише деякі штами характеризувались значною ксиланазною активністю, як у випадку *Aspergillus clavatus* [21].

При визначенні ферментативної активності ендоефітних мікроорганізмів слід враховувати спектр субстратів, які вони можуть трансформувати [20, 22, 23]. Наші дослідження показали, що ендоефіти здатні синтезувати ферменти та гідролізувати більшість рослинних полімерів, що узгоджується з даними літератури [2, 5].

Виходячи з отриманих результатів, імовірно, що саме низький або помірний рівень целюлазної активності грибів-ендоефітів обумовлює існування цієї групи грибів у тканинах рослин-хазяїнів, у результаті якого гриб виважено використовує як джерела живлення живі та відмерлі клітини рослин. Ксиланазна активність ґрунтових штамів *P. funiculosum* була значно вищою, ніж у ендоефітних ізолятів [20, 23]. Оскільки ендоефітні симбіонти вже присутні у відмерлих тканинах рослин, вони можуть ініціювати процес їх гідролізу раніше, ніж сапрофітні види. Нами встановлено, що синтез гідролітичних ферментів ендоефітними видами важливий для живлення гриба не лише упродовж ендоефітної стадії, але й сапрофітного етапу його розвитку, що узгоджується з даними інших авторів [22]. Отримані експериментальні дані можуть бути основою для пояснення ендоефітного способу існування в рослині, а також пошуку продуцентів комплексів гідролітичних ферментів для сучасних біотехнологій.

Роботу виконано за фінансової підтримки цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії».

**Е.М. Юрьева, И.Н. Курченко, С.А. Сырчин, Е.С. Харкевич,
А.К. Павличенко, Л.Т. Наконечная**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного 154, Киев, 03143, Украина*

ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ И КСИЛАЗНАЯ АКТИВНОСТИ ЭНДОФИТНЫХ И ПОЧВЕННЫХ ШТАММОВ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* ТИПОМ

Резюме

Цель. Провести сравнительное изучение целлюлазной и ксиланазной активностей 16 эндоефітних и почвенных штаммов *Penicillium funiculosum*. **Методы.** Объектами исследования были 16 эндоефітних и почвенных штаммов *P. funiculosum* из

коллекции культур микроскопических грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Целлюлазную и ксиланазную активности определяли по величине зоны ферментативной активности на агаризованных средах с растворимыми целлюлозными (Na-КМЦ) и гемицеллюлозными (ксилан) субстратами, рассчитывали энзиматический индекс (EI). **Результаты.** Все исследованные штаммы *P. funiculosum*, независимо от источника выделения, способны гидролизовать Na-КМЦ и буковый ксилан. Впервые для характеристики целлюлазной и ксиланазной активностей штаммов *P. funiculosum* из разных экониш рассчитан энзиматический индекс. Установлено, что целлюлазная активность эндофитных штаммов *P. funiculosum* была умеренной, у почвенных изолятов – от низкой до высокой. Эндофиты проявили низкую и умеренную ксиланазную активность, в то время как почвенные характеризовались исключительно высокой активностью. **Выводы.** Установлено, что эндофитные и почвенные штаммы *P. funiculosum* способны гидролизовать Na-КМЦ и буковый ксилан, причем эндофиты характеризовались умеренной целлюлазной активностью, а у почвенных штаммов ее уровень был от низкого до высокого. Ксиланазная активность эндофитов была низкой, а у почвенных изолятов – исключительно высокой. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для объяснения эндофитного способа существования *P. funiculosum* в растении, а также поиска продуцентов комплексов гидролитических ферментов для современных биотехнологий.

Ключевые слова: *Penicillium funiculosum*, эндофиты, сапрофиты, целлюлазная и ксиланазная активности, энзиматический индекс.

*O.M. Yurieva, I.M. Kurchenko, S.O. Syrchin, O.S. Kharkevych,
A.K. Pavlychenko, L.T. Nakonechna*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

CELLULASE AND XYLANASE ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC AND SOIL *PENICILLIUM FUNICULOSUM* STRAINS

Summary

Aim. To carry out a comparative study of cellulase and xylanase activities of 16 endophytic and soil *Penicillium funiculosum* strains. **Methods.** The objects of the study were 16 endophytic and soil *P. funiculosum* strains from culture collection of microscopic fungi of Department of Physiology and Taxonomy of Micromycetes of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU. Cellulase and xylanase activities were determined by enzyme activity zone on solid agar media with soluble cellulose (Na-CMC) and hemicellulose (xylan) and by enzymatic index (EI). **Results.** All investigated *P. funiculosum* strains, regardless of the isolation place, can hydrolyze Na-CMC and beech xylan. Enzymatic index was studied to characterize cellulolytic and xylanolytic activities of *P. funiculosum* strains from different econiches for the first time. It was established that cellulase activity of endophytic *P. funiculosum* strains was medium and soil ones – from low to high. Endophytic strains showed low and medium xylanase activity, while the soil strains had only high activity. **Conclusions.** It was established that endophytic and soil *P. funiculosum* strains were able to hydrolyze Na-CMC and beech xylan, while endophytes characterized by medium cellulase activity, and soil strains had from low to

high level of this activity. Xylanase activity of endophytes was low, but soil isolates – only high one. Obtained experimental data might be the basis for explaining of endophytic life style of *P. funiculosum* in the plant, as well as in screening of producers of hydrolytic enzyme complexes for biotechnological purposes.

Key words: *Penicillium funiculosum*, endophytes, saprophytes, cellulase and xylanase activities, enzymatic index.

1. Билай В.И., Билай Т.И., Мусич Е.Г. Трансформация целлюлозы грибами. – Киев: Наук. думка, 1982. – 296 с.
2. Жданова Н.Н., Захарченко В.А., Василевская А.И. и др. Микобиота Украинского Полесья: последствия Чернобыльской катастрофы. – Киев: Наук. думка, 2013. – 383 с.
3. Коваль Е.З., Митківська Т.І. Мікологічне обстеження музейних пам'яток. – Київ: ННДРЦУ, 2014. – 240 с.
4. Кураков А.В., Геворкян С.А., Гогинян В.Б., Озерская С.М. Разнообразие и особенности состава микроскопических грибов на синтетических полимерных материалах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – 44, № 2. – С. 232–235.
5. Курченко І.М. Біорізноманітність та еколого-фізіологічні особливості ендofітних мікроміцетів рослин сфагнових боліт Полісся України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія». – Київ, 2014. – 40 с.
6. Курченко І.М., Жданова Н.М., Соколова О.В. Вивчення наявності деяких гідролітичних та окисно-відновних ферментів у штамів *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans., ізольованих з різних місцеперебувань // Мікробіологічний журнал. – 2001. – 63, № 5. – С. 34–44.
7. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. – Москва: Медицина для всех, 2005. – 196 с.
8. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
9. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. – Москва: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1988. – 220 с.
10. Adejuwon A.O., Oni A.O., Ajayi A.A. et al. Cellulase activity in tomato fruits infected with *Penicillium funiculosum* Thom // African Journal of Plant Science. – 2009. – 3, N 5. – P. 113–116.
11. de Castro A.M., Ferreira L.S.G., Pereira N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2010. – 37, N 2. – P. 151–158.
12. Colonia B.S.O., Chagas A.F.J. Screening and detection of extracellular cellulases (endo- and exo-glucanases) secreted by filamentous fungi isolated from soil using rapid tests with chromogenic dyes // African Journal of Biotechnology. – 2014. – 13, N 52. – P. 4694–4701.
13. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi / Second edition. – Eching: IHW-Verlag, 2007. – 672 p.
14. Florencio C., Couri S., Farinas C.S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the production by *Trichoderma* strains // Enzyme Research. – 2012. DOI:10.1155/2012/793708.

15. *Gusakov A.V., Sinitsyn A.P.* Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass // *Biofuels*. – 2012. – 3, N 4. – P. 463–477.
16. *Hankin L., Anagnostakis S.L.* The use of solid media for detection of enzyme production by fungi // *Mycologia*. – 1975. – 67, N 3. – P. 597–607.
17. *Jorgensen H., Olsson L.* Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT20888–effect of substrate on hydrolytic performance // *Enzyme Microbial Technology*. – 2006. – 38, N 3-4. – P. 381–390.
18. *Khan A.L., Lee I.J.* Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during cooper stress // *BMC Plant Biology*. – 2013. – 13:86. DOI: 10.1186/1471-2229-13-86.
19. *Molitoris H.P., Schaumann K.* Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi // *The biology of marine fungi* / Ed. S.T. Moss. – Cambridge: Cambridge University Press, 1986. – P. 35–47.
20. *Partida-Martínez L.P., Heil M.* The microbe-free plant: fact or artifact? // *Frontiers in Plant Science*. – 2011. – 100, N 2. – P. 1–16.
21. *Ribeiro L.F.C., Ribeiro L.F., Jorge J.A. et al.* Screening of filamentous fungi for xylanases and cellulases not inhibited by xylose and glucose // *British Biotechnology Journal*. – 2014. – 4, N 1. – P. 30–39.
22. *Robl D., da Silva Delabona P., Montanari Mergel C. et al.* The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes // *BMC Biotechnology*. – 2013. 13:94. DOI: 10.1186/1472-6750-13-94.
23. *Rodriguez R.J., White J.F., Jr, Arnold A.E. et al.* Fungal endophytes: Diversity and functional roles // *New Phytologist*. – 2009. – 182, N 2. – P. 314–330.
24. *Teather R.M., Wood P.J.* Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1982. – 43, N 4. – P. 777–780.
25. *Wykyan J.P.N., Leagale P.B.* Saccharification of wastepaper mixtures with cellulose from *Penicillium funiculosum* // *Biotechnology Letters*. – 2001. – 23, N 22. – P. 1849–1852.

Отримано 27.04.2016