

УДК 577.152.321+663.11

НОВІ ПРОДУЦЕНТИ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ СЕРЕД ВИЩИХ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ

К. Г. Древаль
М. І. Бойко

Донецький національний університет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Проаналізовано активність целюлаз у культуральних фільтратах 61 штаму 18 видів базидіальних грибів, що належать до родів *Schizophyllum*, *Trichaptum*, *Irpex*, *Fomes*, *Trametes* (= *Coriolus*), *Pleurotus*, *Daedaleopsis*, *Lepista*, *Inonotus*, *Stereum*, *Heterobasidion*, *Auricularia*, *Chondrostereum*, *Phellinus*, *Hirschioporus* та *Flammulina*. Активність целюлаз і склад комплексу целюлозолітичних ензимів базидіоміцетів відрізняються у штамів одного виду. На ранніх етапах освоєння субстрату базидіоміцети виділяють високоактивну ендоглюканазу. Базидіоміцети є активними продуцентами целюлаз і можуть бути перспективними об'єктами біотехнології целюлозолітичних ензимів.

Ключові слова: базидіоміцети, целюлозолітичні ензими, культуральний фільтрат, ендоглюканаза, β -глюкозидаза, біотехнологія целюлаз.

Біоконверсію відтворювальної рослинної сировини у паливо, кормові та харчові продукти, напівпродукти для хімічної та мікробіологічної промисловості у наш час розглядають як одну з ключових галузей біотехнології [1]. Ензиматичне перетворення целюлози як одного з найпоширеніших природних полімерів перспективне з погляду створення самостійних маловідходних технологій та зниження екологічної небезпеки різноманітних підприємств, що переробляють рослинну сировину з утворенням великої кількості відходів. Однією з основних причин, що стримує промислове впровадження біодеструкції целюлози, є відсутність високоактивних та економічно ефективних продуцентів ензимів целюлозолітичної дії [2, 3].

Поза сумнівом, роль дереворуйнівних грибів у розкладанні лігніноцелюлоз деревини велика [4, 5]. Однак швидкість освоєння субстрату, ступінь його деструкції та інші параметри істотно різняться у різних видів і штамів. У зв'язку з цим слід вивчити велику кількість культур грибів у процесі пошуку перспективних штамів [5]. Окрім того, аналіз літератури [6–10] показав, що дані активності целюлозолітичних ензимів вищих базидіоміцетів неоднозначні, розрінені та невпорядковані, майже відсутні результати сучасних досліджень активності целюлаз базидіоміцетів, що потребує проведення широких досліджень у цьому напрямі.

Метою роботи було виявлення здатності до синтезу целюлаз вищими базидіальними грибами.

Матеріали і методи

Визначали здатність базидіоміцетів продукувати в живильне середовище ензими комплексу целюлаз [ендоглюканази (КФ 3.2.1.4), целобіогідролази (КФ 3.2.1.91) та целобіази (КФ 3.2.1.21)]. Дослідження проводили на 61 штамі базидіоміцетів, що належать до 18 видів. Деякі з них були свіжоізольованими відповідно до загальноприйнятих методик [11] із плодкових тіл грибів, зібраних у межах м. Донецька та Донецької області, а саме штами видів: *Schizophyllum commune* Fr.: SC-21, SC-2-S8, SC-8-6, SC-8, SC-1; *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarden: T3; *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.: J-II-2, II-p, II-10, II-9; *Fomes fomentarius* (L.) J. Kickx f.: MS-1, MS-B; *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm: PO-2, II-55, T-62, T-52; *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.: Ssh-2, Sh-3, Sh-7, Sh-1, OsdS-2; *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schrot.: AnSc-1, AnG-2; *Lepista personata* (Fr.) Cooke: P-1, P-2, P-3, P-4, P-5, P-11; *Phellinus pomaceus* (Pers.) Maire: J-2An; *Trametes* (= *Coriolus*) *versicolor* (L.) Lloyd: TV-9, TV-2, CV-1; *Trametes* (= *Coriolus*) *hirsuta* (Wulfen) Lloyd: J-1C та *Chondrostereum purpureum* (Pers.) Pouzar: Hp-10, Hp-9. Деякі штами було взято з колекції культур

базидіальних грибів кафедри фізіології рослин біологічного факультету Донецького національного університету, зокрема штами таких видів: *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.: I-6, K-1, D-1, C-06, Ч-03, P-04, B-04, A-Дон-02; *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst.: CS-1; *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.: HA-6-96 (депонований у колекції культур базидіомицетів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного), НЦСГ, НЦСГ-1м, НЦСГ-2м, BE-08; *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quel.: A-3, A-1; *Phellinus igniarius* (L.) Quel.: Ph.lg; *Hirschioporus laricinus* (P. Karst.) Teram.: M-81; *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm: P-203, P-035, P-191 (депоновані в колекції культур базидіомицетів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного) та *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer: F-202, F-104, F-03, F-102 (депонований у колекції культур базидіомицетів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного).

Для дослідження целюлозолітичної активності штами культивували на рідкому середовищі Чапека такого складу (г/л): NaNO_3 — 2, K_2HPO_4 — 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KCl — 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 [11]. Кислотність живильного середовища доводили до значення pH 5,0 за допомогою 10% -го розчину HCl . Як єдине джерело вуглецю до середовища додавали фільтрувальний папір Whatman №1 у кількості 130 мг. Активність целюлозолітичних ензимів визначали в культуральному фільтраті (КФ) штамі на 7-му та 14-ту добу культивування (для отримання даних, які узгоджуються з описаними в літературі). Культивування проводили при температурах, оптимальних для росту штамі.

Активність ензимів целюлозолітичного комплексу визначали відносно таких субстратів: фільтрувальний папір (Whatman №1, щільність 80 г/м²) — загальна целюлозолітична активність, Na-карбоксиметилцелюлоза (C5678, Sigma, Німеччина), гідроксіетилцелюлоза (54290, Sigma, Німеччина) — ендоглюканазна активність та целобіоза (22150, Sigma, Німеччина) — целобіазна активність. Склад реакційних сумішей для визначення ензиматичної активності та умови проведення реакцій були у строгій відповідності до рекомендацій IUPAC [12] та загальноприйнятих методик [7, 11, 13, 14]. Обчислюючи результати, за одиницю активності (IU) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкмоль редукуючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв в умовах досліду. Питому активність (IU/mg) встановлювали за відношенням загальної активності культурального фільтрату (IU/ml)

до вмісту протеїну в культуральному фільтраті (mg/ml). Редукуючі цукри визначали методом Шомодї–Нельсона (калібрувальну криву побудовано за глюкозою) [7, 11, 13, 15], а глюкозу — глюкозооксидазно-пероксидазним методом з використанням набору реактивів для визначення глюкози у біологічних рідинах («Реагент», м. Дніпропетровськ). Вміст протеїну в КФ встановлювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [16].

Усі дослідження проводили у трикратній повторності. Статистичну обробку здійснювали методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх — методом Дункана [17].

Результати та обговорення

На рис. 1 показано питому целюлозолітичну активність КФ штамі базидіомицетів на 7-му та 14-ту добу культивування відносно фільтрувального паперу (ФП). У процесі росту більшості штамі їхня целюлазна активність збільшується з 7-ї на 14-ту добу культивування, це може свідчити про те, що базидіомицети адаптуються до нових умов існування тривалий час. Значення питомої целюлазної активності штамі, що належать до одного й того самого виду, суттєво відрізняються (рис. 1). Це можна пояснити ймовірною мінливістю здатності базидіомицетів до синтезу целюлази залежно від породи деревини, на якій було зібрано плодове тіло гриба, тривалості перебування штаму в чистій культурі, індивідуальної мінливості штамі тощо. Штами 13 видів (крім *F. fomentarius*, *I. radiatus*, *A. auricula-judae*, *P. igniarius* та *F. velutipes*) з досліджуваних базидіомицетів виявили активність стосовно ФП більше 1 IU/mg, що в порівнянні з існуючими нині промисловими препаратами целюлази [18] робить їх перспективними об'єктами для подальших досліджень.

Питому активність КФ штамі базидіомицетів у процесі культивування відносно Na-карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) показано на рис. 2. Як відносно ФП, так і Na-КМЦ питома целюлазна активність у КФ у різних штамі одного виду істотно відрізнялась. Однак не виявлено жодних закономірностей щодо того, які штами виявляють меншу активність. Целюлази у КФ всіх досліджених грибів були здатні до розщеплення молекули Na-КМЦ з утворенням редукуючих цукрів. Відносно цього субстрату приблизно половина з досліджуваних штамі виявляли вищу целюлозолітичну активність на 7-му добу, а друга половина — на 14-ту

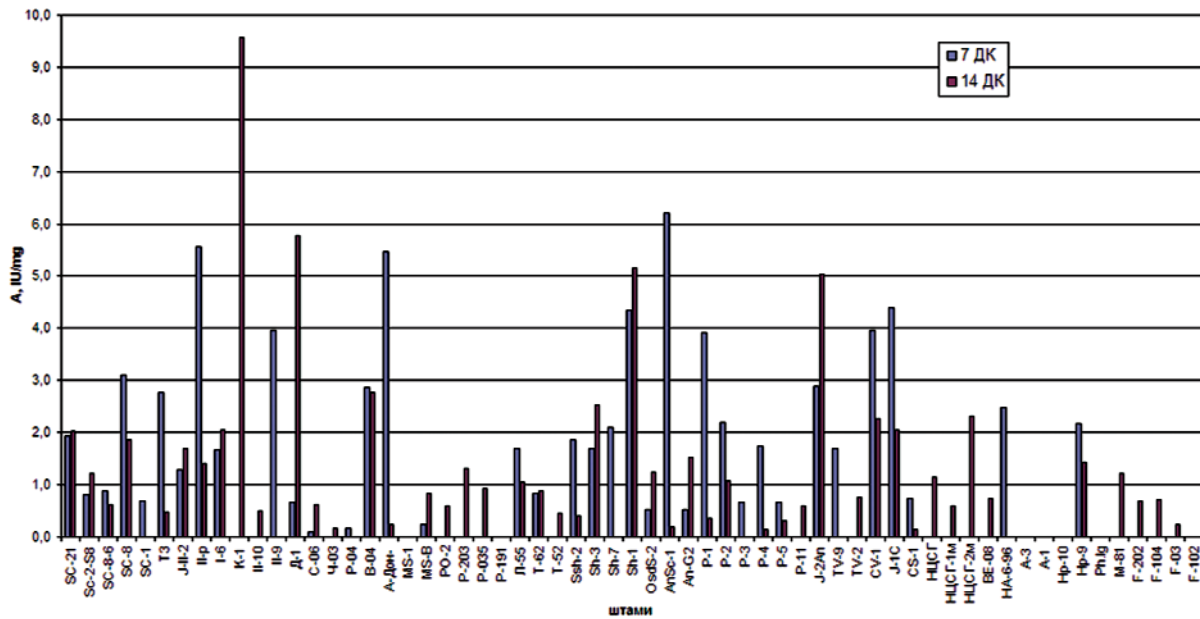


Рис. 1. Питома целюлозолітична активність культуральних фільтратів штамів базидіоміцетів відносно фільтрувального паперу на 7-му (7 ДК) та 14-ту (14 ДК) добу культивування

добу культивування. Це свідчить про те, що на 7-му добу культивування склад целюлазного комплексу в КФ базидіоміцетів ще продовжує формуватись, і в ньому вже присутні протеїни, що розщеплюють молекули Na-КМЦ (ендоглюканаз), однак склад комплексу ще неповний, тому здатність до гідролізу ФП виражена слабо.

Питому целюлозолітичну активність у КФ усіх штамів визначено також і стосовно гідроксіетилцелюлози (ГЕЦ), що показано на рис. 3. Приблизно половина досліджува-

них штамів виявляли більшу активність відносно ГЕЦ на 7-му добу культивування, а половина — на 14-ту добу. Як і стосовно ФП та Na-КМЦ, для різних штамів одного виду базидіоміцетів питома целюлазна активність відносно ГЕЦ була різною. Активність щодо цього субстрату може слугувати додатковим тестом на визначення внеску ендоглюканаз в активність усього комплексу целюлаз, тому в процесі роботи було зіставлено значення питомої активності КФ базидіоміцетів відносно Na-КМЦ та ГЕЦ. Загалом,

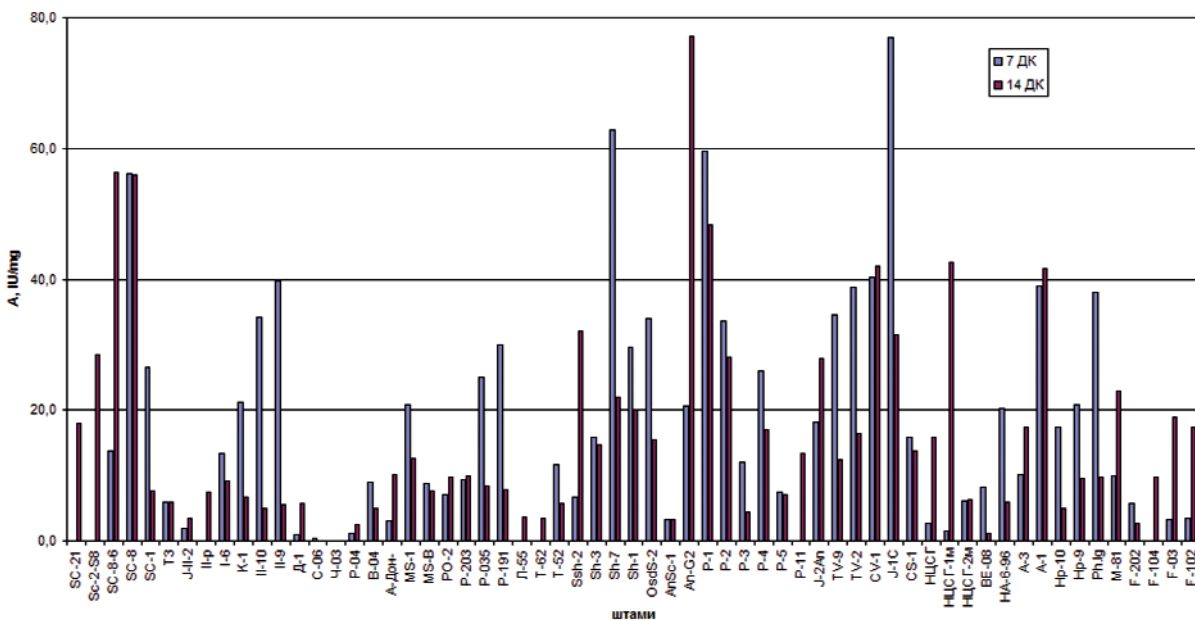


Рис. 2. Питома целюлозолітична активність культуральних фільтратів штамів базидіоміцетів відносно Na-карбоксиметилцелюлози на 7-му (7 ДК) та 14-ту (14 ДК) добу культивування

значення питомої активності щодо цих субстратів є зіставними: більшість із них — до 20 IU/mg, менша кількість зафіксованих значень — у проміжку від 20 до 40 IU/mg, ще менше — від 40 до 60 IU/mg, питому активність вище 60 IU/mg зафіксовано в незначній кількості випадків. Динаміка активності відносно цих субстратів є близькою для 39 штамів (64% від загальної кількості досліджуваних культур). Це вказує на те, що для цих культур відносно зазначених субстратів визначено активність саме ендоглюканази у складі комплексу целюлозолітичних ензимів. Із 39 штамів 22 виявляли максимальну активність на 7-му і 17 — на 14-ту добу культивування. Отже, у 22 досліджуваних штамів, для яких можна з упевненістю розглядати внесок ендоглюканази в активність целюлазного комплексу, на перших етапах освоєння целюлазного субстрату синтезується високоактивна ендоглюканаза, що підтверджує сучасні уявлення про процес гідролізу нативної целюлози [7] та поширює їх і на целюлозолітичні ензими досліджених базидіоміцетів.

Питому активність КФ базидіоміцетів стосовно целобіози як субстрату для визначення целюлозолітичної активності показано на рис. 4. Активність целобіази приблизно у половини штамів була максимальною на 7-му добу культивування, а на 14-ту добу проведення досліді — для другої половини досліджених культур. Як і відносно інших субстратів, здатність целюлаз у КФ -штамів утворювати глюкозу з молекули целобіози

істотно відрізнялась у межах представників одного виду. Для культур П-р *I. lacteus*, P-101, T-52 *P. ostreatus*, OsdS-2 *S. hirsutum*, НЦСТ-2м, НА-6-96 *H. annosum* та F-102 *F. velutipes* не було зафіксовано активності целобіази в складі комплексу целюлозолітичних ензимів упродовж усього періоду культивування. Враховуючи те, що для цих культур виявлено активність целюлозолітичних ензимів відносно інших субстратів, а також зважаючи на високий вміст редуруючих цукрів у КФ, які утворились із фільтрувального паперу протягом часу культивування, можна припустити, що в цих штамів до складу целюлозолітичного комплексу входить високоспецифічна β-глюкозидаза, не здатна розщеплювати дисахариди, у яких глюконова та аглюконова частини представлені однаковими залишками (арил-β-D-глюкозидаза). З цього випливає, що склад комплексу целюлозолітичних ензимів може відрізнятися у штамів базидіоміцетів одного виду.

Аналіз отриманих результатів показує, що целюлозолітичні ензими у КФ — штамів базидіоміцетів найлегше гідролізують целобіозу, складніше — розчинні похідні целюлози — ГЕЦ та На-КМЦ, а найнижчу активність виявляють до ФП. Це цілком закономірно, оскільки з усіх застосованих в роботі субстратів ФП є найбільш складним об'єктом гідролізу. Під час пошуку перспективних продуцентів целюлозолітичних ензимів передусім слід мати на увазі здатність грибів

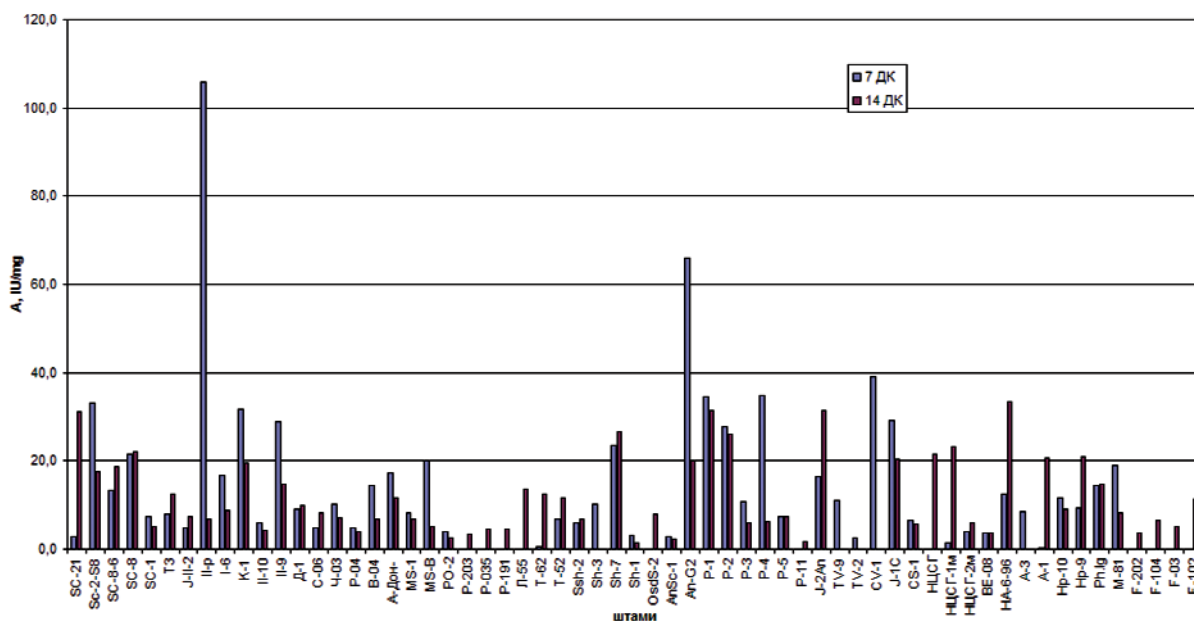


Рис. 3. Питому целюлозолітична активність культуральних фільтратів штамів базидіоміцетів відносно гідроксіетилцелюлози на 7-му (7 ДК) та 14-ту (14 ДК) добу культивування

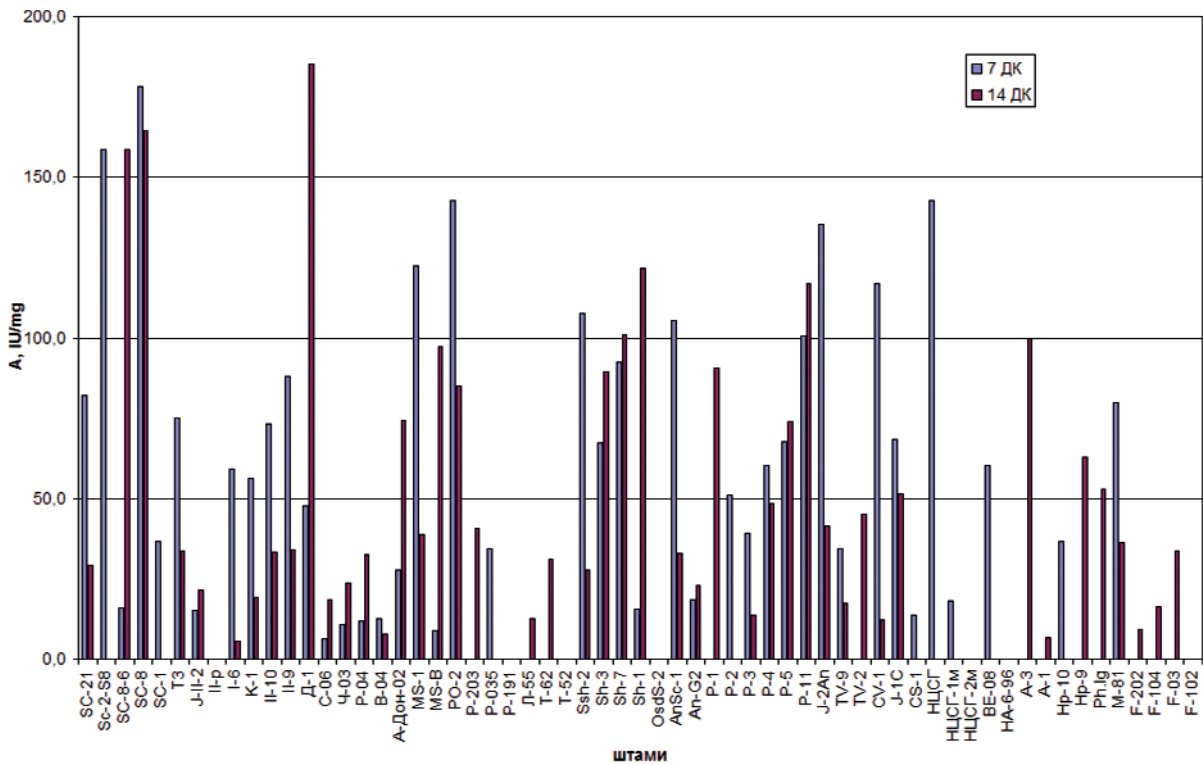


Рис. 4. Питома целюлозолітична активність культуральних фільтратів штамів базидіоміцетів відносно целобіози на 7-му (7 ДК) та 14-ту (14 ДК) добу культивування

руйнувати саме ФП, оскільки в гідролізі інших субстратів можуть брати участь не лише целюлозолітичні ензими. Значення питомої активності КФ штамів базидіоміцетів відносно ФП свідчать, що найбільш активними продуцентами целюлаз є штами К-1, Д-1, II-p, А-Дон-02 *I. lacteus*, AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*, Sh-1 *S. hirsutum* та J-2An *P. rotaceus*. Однак для культури II-p *I. lacteus* не зафіксовано активності целобіази,

що вказує на нездатність целюлаз цього штаму розщеплювати нативну целюлозу до простих моноцукрів. Після оптимізації умов культивування зазначених вище шести штамів їх можна використовувати як продуценти целюлаз у біотехнології.

Роботу виконано за спонсорської підтримки громадської організації «Развитие» (Росія).

ЛІТЕРАТУРА

1. Беккер З. Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд-во МГУ, 1988. — 230 с.
2. Лобачева Г. К., Желтобрюхов В. Ф., Прокопов В. И. и др. Состояние вопроса об отходах и современных способах их переработки: Учеб. пособие. — Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2005. — 176 с.
3. Никольский К. С., Рябков В. В., Рабинович М. Л. // Химия раст. сырья. — 2004. — № 2. — С. 77–81.
4. Волова Т. Г. Биотехнология. — Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Рос. акад. наук, 1999. — 252 с.
5. Золотарев Ф. Н., Головина Г. И., Сивочуб О. А. Деградация лигнина базидиомицетами // Микол. фитопатол. — 1990. — Т. 24, Вып. 1., С. 51 — 56.
6. Ферментные системы высших базидиомицетов / Под ред. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
7. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Учеб. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
8. Комарницкий И. К. Изучение целлюлозолитических ферментов у некоторых дереворазрушающих грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К. 1975. — 28 с.
9. Ліновицька В. М., Бухало А. С. Ріст та біосинтетична активність *Grifola frondosa* // Укр. ботан. журн. — 2008. — Т. 65, № 1. — С. 116–123.
10. Рабинович М. Л., Мельник М. С. Структура и механизм действия целлюлолитических

- ферментов // Успехи биол. химии. — 2000. — № 40. — С. 205–266.
11. *Билай В. И.* Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.
 12. *Ghose T. K.* Measurement of cellulase activities // *Pure Appl. Chem.* — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
 13. *Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусakov А. В.* Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. — 1993. — Т. 25. — 152 с.
 14. *Mullings R.* Measurement of saccharification by cellulases // *Enzyme Microb. Technol.* — 1985. — V. 7, N 12. — P. 586–591.
 15. *Nelson N.* Aphotometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // *J. Biol. Chem.* — 1944. — V. 153, N 2. — P. 375–379.
 16. *Дарбре А.* Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
 17. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібн. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
 18. *Скомаровский А. А., Марков А. В., Гусakov А. В. и др.* Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2006. — Т. 42, № 6. — С. 674–680.

**НОВЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ
ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ
СРЕДИ ВЫСШИХ
БАЗИДАЛЬНЫХ ГРИБОВ**

*К. Г. Древаль
М. И. Бойко*

Донецкий национальный университет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Проанализирована активность целлюлаз в культуральных фильтратах 61 штамма 18 видов базидиальных грибов, принадлежащих к родам *Schizophyllum*, *Trichaptum*, *Irpex*, *Fomes*, *Trametes* (= *Coriolus*), *Pleurotus*, *Daedaleopsis*, *Lepista*, *Inonotus*, *Stereum*, *Heterobasidion*, *Auricularia*, *Chondrostereum*, *Phellinus*, *Hirschioporus* и *Flammulina*. Активность целлюлаз и состав комплекса целлюлозолитических энзимов базидиомицетов отличаются у штаммов одного вида. На ранних этапах освоения субстрата базидиомицеты синтезируют высокоактивную эндоглюканазу. Базидиомицеты являются активными продуцентами целлюлаз и могут быть перспективными объектами биотехнологии целлюлозолитических энзимов.

Ключевые слова: базидиомицеты, целлюлозолитические энзимы, культуральный фильтрат, эндоглюканаза, β -глюкозидаза, биотехнология целлюлаз.

**PERSPECTIVE PRODUCERS
OF CELLULASES AMONG
HIGHER BASIDIOMYCETES**

*K. Dreval
M. Boyko*

Donetsk National University

E-mail: k.dreval@gmail.com

Cellulase activity in cultural filtrate of 61 strains of basidiomycetes that belongs to 18 species *Schizophyllum*, *Trichaptum*, *Irpex*, *Fomes*, *Trametes* (= *Coriolus*), *Pleurotus*, *Daedaleopsis*, *Lepista*, *Inonotus*, *Stereum*, *Heterobasidion*, *Auricularia*, *Chondrostereum*, *Phellinus*, *Hirschioporus* and *Flammulina* was analyzed. Difference between cellulases activity and that of the complex composition of cellulolytic enzyme basidiomycetes for different strains of the same species was established. At an early stage of the substrate development basidiomycetes synthesize highly active endoglucanase. Basidiomycetes are active cellulase producers and are perspective objects for biotechnology of cellulolytic enzymes.

Key words: basidiomycetes, cellulolytic enzymes, cultural liquid, endoglucanase, β -glucosidase, biotechnology of cellulases.