

# КУЛЬТИВУВАННЯ БАЗИДИОМІЦЕТІВ — АКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ. II. ЕНДОГЛЮКАНАЗНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ФІЛЬТРАТІВ БАЗИДИОМІЦЕТІВ СТОСОВНО Na-КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЮЛОЗИ

К. Г. Древаль

Донецький національний університет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Отримано 06.10.2011

Проведено підбір умов культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлаз за факторами рН живильного середовища (градації змінювались від 3 до 9 рН із кроком 1 од) і температури (значення змінювались від 24 °С до 36 °С із кроком 2 °С) з метою збільшення синтезу ними ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4). Визначали ензиматичну активність стосовно Na-карбоксиметилцелюлози. Встановлено, що оптимальною початковою кислотністю живильного середовища для всіх штамів є рН 7, а температурою культивування — 24 °С для штамів А-Дон-02 *Irpex lacteus*, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, Sh-1 *Stereum hirsutum*, 34 °С для К-1 *Irpex lacteus* та 36 °С для Д-1 *Irpex lacteus*. У результаті підбору умов культивування значення ендоглюканазної активності зросли в 1,59 раза для штаму Sh-1 *Stereum hirsutum*, у 2,51 раза для А-Дон-02 *Irpex lacteus*, у 3,02 раза для К-1 *Irpex lacteus*, у 3,69 раза для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* та у 12,16 раза для штаму Д-1 *Irpex lacteus*. Водночас, у результаті оптимізації умов культивування питома ендоглюканазна активність штаму К-1 *Irpex lacteus* зросла у 3,54 раза, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — у 5,12, Д-1 *Irpex lacteus* — у 7,86 та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — у 17,98 раза. Штам J-2An *Phellinus pomaceus* не виявив активності ендоглюканаза у жодному варіанті досліду. Максимальну ендоглюканазну активність щодо Na-карбоксиметилцелюлози для культур К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* встановлено на 7-му добу культивування, тимчасом як для культури Sh-1 *S. hirsutum* — на 14-ту добу експерименту.

**Ключові слова:** базидіоміцети, ендоглюканаза, Na-карбоксиметилцелюлоза, температура культивування, кислотність середовища, оптимізація, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.

Дедалі більшу увагу світова спільнота приділяє пошукові та використанню альтернативних джерел енергії, передусім відновлювальних [1]. Розробка технології отримання паливного етанолу з рослинної біомаси та її широке впровадження у виробництво має важливе економічне значення і може розглядатись як один із чинників забезпечення енергетичної незалежності України [2–5]. Одним із факторів, що стримує промислове впровадження таких технологій у виробництво, є нестача високоактивних продуцентів целюлаз. Нами знайдено штами базидіальних грибів, які можуть бути перспективними об'єктами біотехнології целюлаз [6]; наступним етапом дослідження їхньої фізіологічної здатності до гідролізу целюлози є оптимізація фізико-хімічних умов культивування.

Одним з основних ензимів, що входить до складу целюлазного комплексу, є ендоглюканаза, оскільки вона першою атакує

молекули нативної целюлози [7–9]. Специфічним субстратом, стосовно якого визначають активність саме ендоглюканази у складі целюлазного комплексу, є розчин Na-карбоксиметилцелюлози [7–11].

Метою роботи було визначення оптимальних значень температури та рН живильного середовища для культивування деяких штамів базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів для підвищення синтезу ендоглюканази та її активності щодо розчину Na-карбоксиметилцелюлози.

## Матеріали і методи

Визначали вплив початкової кислотності живильного середовища та температури культивування на здатність базидіоміцетів до синтезу ендоглюканази (КФ 3.2.1.4) у складі целюлозолітичного комплексу. Об'єктами досліджень були 6 штамів вищих

базидіальних грибів, які на попередньому етапі скринінгу [6] відібрано як активні продуценти целюлозолітичних ензимів: К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.; Sh-1 *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.; AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schrot. та J-2An *Phellinus pomaceus* (Pers.) Maire.

Для дослідження ендоглюканазної активності штами культивували на рідкому середовищі Чапека такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5,  $\text{KCl}$  — 0,5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,01 [8]. Початкову кислотність живильного середовища доводили до значень від 3 до 9 рН із кроком 1 рН за допомогою 10%-х розчинів  $\text{HCl}$  або  $\text{NaOH}$  на аналізаторі іонів АІ-123 (Україна). Культивування проводили протягом 14 діб за температури від 24 до 36 °С з інтервалом 2 °С в термостатах ТС-80 та ТС-80-М2 (Росія). Як єдине джерело вуглецю до середовища додавали фільтрувальний папір Whatman № 1 в кількості 8 г/л.

Ендоглюканазну активність ензимів у складі целюлозолітичного комплексу культуральних фільтратів (КФ) базидіоміцетів визначали стосовно 2%-го розчину Na-карбоксиметилцелюлози (Sigma, Німеччина). Склад реакційних сумішей під час встановлення ензиматичної активності та умови проведення реакцій були у строгій відповідності до рекомендацій IUPAC [9] і загальноприйнятих методик [8, 9]. Обчислюючи результати, за одиницю активності (IU) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкМ редукуючих цукрів протягом 1 хв в умовах досліду (рН = 4,8; t = 40 °С). Питому активність (IU/mg) визначали за відношенням загальної активності культурального фільтрату (IU/ml) до вмісту протеїнів у культуральному фільтраті (mg/ml). Редукуючі цукри оцінювали методом Шо-моді-Нельсона (калібрувальний графік будували за глюкозою) [8, 12]. Вміст протеїну в КФ визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [13].

Усі дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали методами дисперсійного аналізу, порівняння середніх — методом Дункана [14].

### Результати та обговорення

Зміну ендоглюканазної активності щодо розчинів Na-карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) залежно від різних градацій фізичних та хімічних чинників на 7-му добу культивування подано на рис. 1, а на 14-ту добу — на рис. 2.

Для штаму К-1 *I. lacteus* (рис. 1, а) характерний один значний пік ендоглюканазної

активності, встановлений за культивування при температурі 34 °С та рН 7. Виявлений максимум перевищує значення ендоглюканазної активності, визначене за неоптимізованих умов культивування, у 3,02 раза. Якщо взяти до уваги значення активності цього штаму, вищі за 6 IU/ml, то можна побачити певне розмежування активності КФ до Na-КМЦ у цього штаму: в діапазонах 24–26 °С та 32–36 °С за кислотності живильного середовища у межах 5–7 рН. Можна припустити, що в штаму К-1 *I. lacteus* є 2 форми ендоглюканази, які відрізняються за своїми фізико-хімічними оптимумами активності. Це узгоджується з даними літератури, які свідчать про існування двох ендоглюканаз — Eg I та Eg II — у целюлозних комплексах більшості організмів [8, 9, 15, 16]. На 14-ту добу культивування ендоглюканазна активність цього штаму була нижчою порівняно зі значеннями, встановленими на 7 добу експерименту (рис. 2, а).

Для штаму А-Дон-02 *I. lacteus* на 7-му добу культивування характерним є певний зсув підвищеної активності ендоглюканази в зону більш високих значень початкового рН живильного середовища (рис. 1, б). Так само, як і в штаму К-1 *I. lacteus*, у штаму А-Дон-02 *I. lacteus* виявляється певний розподіл підвищеної ендоглюканазної активності: за температури культивування 24 °С, 28–30 °С та 34–36 °С при початковій кислотності живильного середовища 7–8 рН. На 14-ту добу культивування встановлено лише один значний пік активності до гідролізу Na-КМЦ штаму А-Дон-02 *I. lacteus* (рис. 2, б). При цьому максимумами ендоглюканазної активності цього штаму, встановлені на 7-му та 14-ту добу культивування, достовірно між собою не відрізняються. Однак, на 7-му добу культивування максимум активності встановлено за температури культивування 24 °С, а на 14-ту добу — за 32 °С. Це також може вказувати на існування у штаму А-Дон-02 *I. lacteus* кількох форм ендоглюканази, які розрізняються не лише за фізико-хімічними оптимумами дії, а й за часом їх синтезу. Абсолютне значення максимальної активності КФ до Na-КМЦ штаму А-Дон-02 *I. lacteus* перевищує неоптимізоване значення у 2,51 раза.

Ендоглюканазна активність штаму Д-1 *I. lacteus* на 7-му добу культивування зростала на живильному середовищі з рН 7 при всіх досліджуваних температурах, крім 30 °С та 36 °С, за кислотності живильного середовища 4–7 рН (рис. 1, в). Абсолютне значення максимальної ендоглюканазної активності цього штаму встановлено на 14-ту добу культи-

ування на живильному середовищі з рН 7 за температури 36 °С. Значення, встановлене за цих умов культивування, перевищувало неоптимізоване значення активності ензимів КФ цієї культури у 12,16 раза. На 14-ту добу культивування чітко простежувалось розмежування фізико-хімічного оптимуму ендоглюканазної активності штаму Д-1 *I. lacteus*, що також може свідчити про існування кількох форм ендоглюканаз у целюлозолітичному комплексі цієї культури.

Ендоглюканазна активність штаму Sh-1 *S. hirsutum* як на 7-му (рис. 1, з), так і на 14-ту (рис. 2, з) добу культивування була достовірно нижчою за ендоглюканазну активність інших досліджуваних штамів. На 7-му добу культивування чітко встановлено зону оптимуму ендоглюканазної активності цього штаму на живильному середовищі з рН 5–7 та за температури 28–32 °С. На 14-ту добу культивування чітко розмежовуються дві зони підвищеної активності цього штаму до гідролізу Na-КМЦ (рис. 2, з). Максимальну ендоглюканазну активність штаму Sh-1 *S. hirsutum* встановлено за культивування на живильному середовищі з рН 7 та температури 24 °С на 14-ту добу експерименту. Значення максимальної активності КФ цього штаму до Na-КМЦ перевищувало неоптимізоване значення в 1,59 раза.

Для штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* на 7-му добу культивування є характерним чітке розмежування зон фізико-хімічних оптимумів ендоглюканазної активності (рис. 1, д), яке втрачається на 14-ту добу експерименту (рис. 2, д). Абсолютне значення максимальної ендоглюканазної активності цього штаму встановлено за температури культивування 32 °С на живильному середовищі з рН 7 на 14-ту добу експерименту, який у 3,69 раза перевищував неоптимізоване значення.

В експерименті за умов дії всіх градацій температури та рН середовища не визначено ендоглюканазної активності КФ штаму J-2An *P. rotaceus*, що показано на рис. 1, е та 2, е. Зважаючи на те, що в умовах експерименту не виявлялось достовірної різниці за вмістом редуруючих цукрів та протеїнів у КФ цього штаму порівняно з контролем (як на 7-му, так і на 14-ту добу), нормальний ріст у культурі на картопляно-глюкозному середовищі, на середовищі Чапека з додаванням глюкози як джерела вуглецю (8 г/л) та накопичення в КФ екзогенних протеїнів у цьому разі, наявність ендоглюканазної активності стосовно Na-КМЦ у штаму J-2An *P. rotaceus* на етапі скринінгу можна розглядати як артефакт, адже дані не відтворено за повторного проведення експерименту.

Паралельно з визначенням загальної ендоглюканазної активності у КФ досліджуваних штамів розраховували питому активність ензимів базидіоміцетів щодо Na-КМЦ. Результати розрахунків наведено на рис. 3

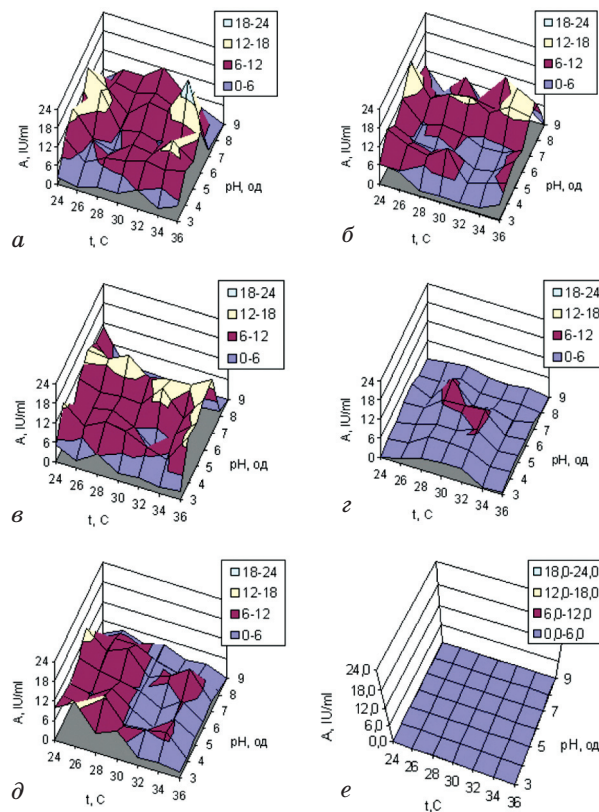


Рис. 1. Ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (з); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту

і 4. Значення питомої ендоглюканазної активності були вищими за значення загальної активності, що вказує на неістотне накопичення протеїнів у КФ досліджуваних штамів. За умов дії різних градацій зазначених факторів питома ендоглюканазна активність штамів змінювалась не аналогічно до загальної ендоглюканазної активності, що свідчить про неоднорідність накопичення протеїнів у КФ базидіоміцетів.

Питома ендоглюканазна активність культури К-1 *I. lacteus* на 7-му добу культивування мала 3 зони підвищеної активності, які знаходились у діапазонах дії температури та рН середовища, близьких до крайніх (рис. 3, а). Максимальне значення питомої активності КФ цього штаму встановлено на живильному середовищі з рН 7 та за температури культивування 34 °С. Оптимізоване значення перевищувало неоптимізовану величи-

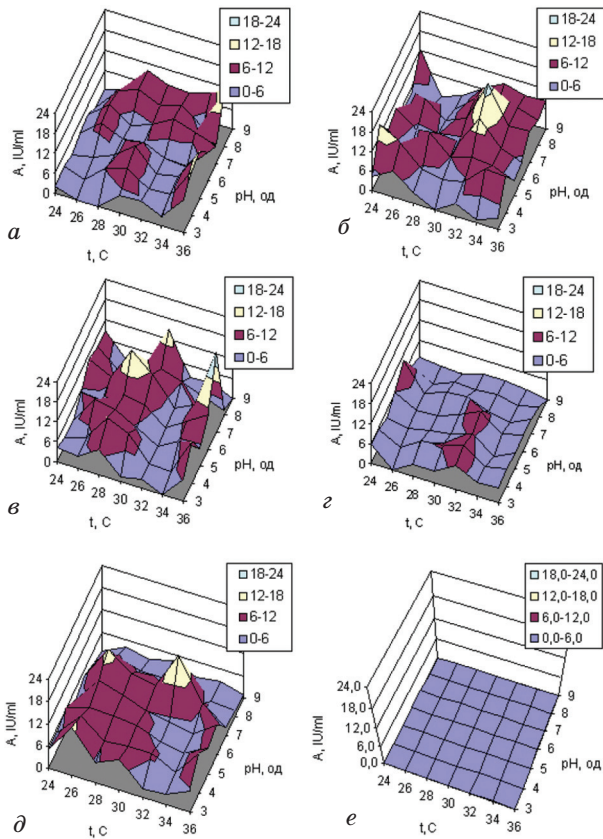


Рис. 2. Ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Ш-1 *Stereum hirsutum* (г); АnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus pomaceus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

ну питомої активності стосовно Na-КМЦ у 3,54 раза. При цьому максимум активності, встановлений за вказаних умов, достовірно перевищував її значення за умов дії інших градацій рН живильного середовища і температури культивування. На 14-ту добу вирощування питома ендоглюканазна активність КФ культури К-1 *I. lacteus* мала високі значення при температурі 36 °С (рис. 4, а), однак ендоглюканазна активність за цих умов була достовірно нижчою порівняно з максимумом, встановленим на 7-му добу експерименту.

Для штаму А-Дон-02 *I. lacteus* максимум питомої ендоглюканазної активності КФ зафіксовано на 7-му добу культивування на живильному середовищі з рН 7 та за температури 24 °С (рис. 3, б). Високі значення активності також встановлено за культивування на середовищі з рН 9, однак воно достовірно нижче за максимальне. Оптимізоване значення питомої ендоглюканазної активності перевищувало неоптимізовану активність цього штаму в 5,12 раза. На 14-ту добу культивування можна побачити

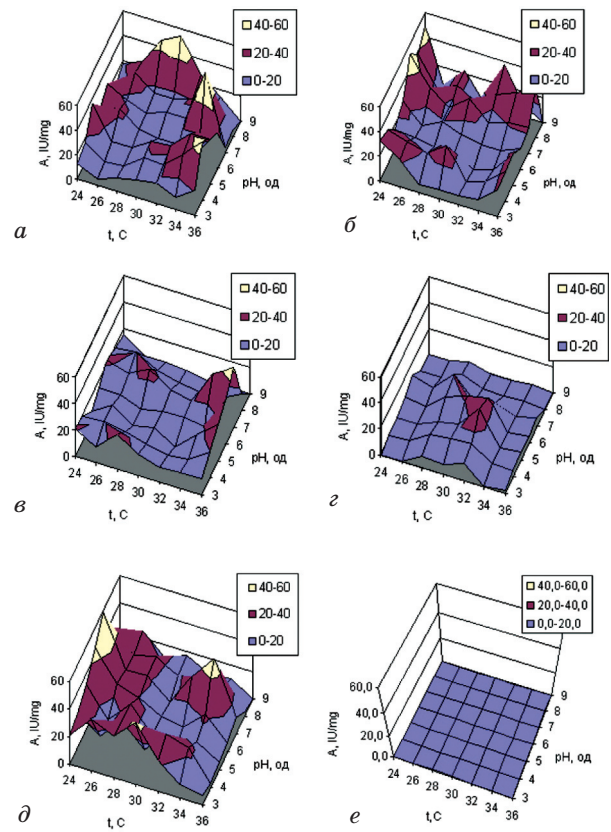


Рис. 3. Питома ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Ш-1 *Stereum hirsutum* (г); АnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus pomaceus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту

певну залежність питомої ендоглюканазної активності штаму А-Дон-02 *I. lacteus* від градацій дії рН та температури (рис. 4, б): підвищені значення активності КФ зафіксовано у крайніх варіантах градацій факторів. Можна припустити, що такі умови є стресовими для організму-продуцента, і як реакція-відповідь підвищується синтез штамом ендоглюканаз, яка бере участь у пристосуванні гриба до відповідного чинника.

Як на 7-му (рис. 3, в), так і на 14-ту (рис. 4, в) добу культивування штаму Д-1 *I. lacteus* високу питому ендоглюканазну активність КФ оцінювали за умов дії крайніх градацій рН і температури. Максимальне значення встановлено на 7-му добу культивування на живильному середовищі з рН 7 за температури 36 °С (рис. 3, в). Оптимізоване значення активності ензиму в 7,86 раза перевищувало неоптимізоване.

З рис. 3, г та 4, г видно, що питома ендоглюканазна активність штаму Ш-1 *S. hirsutum* мала дуже вузькі фізико-хімічні оптимуми дії. Максимальне значення активності КФ цього штаму до гідролізу Na-КМЦ встановлено

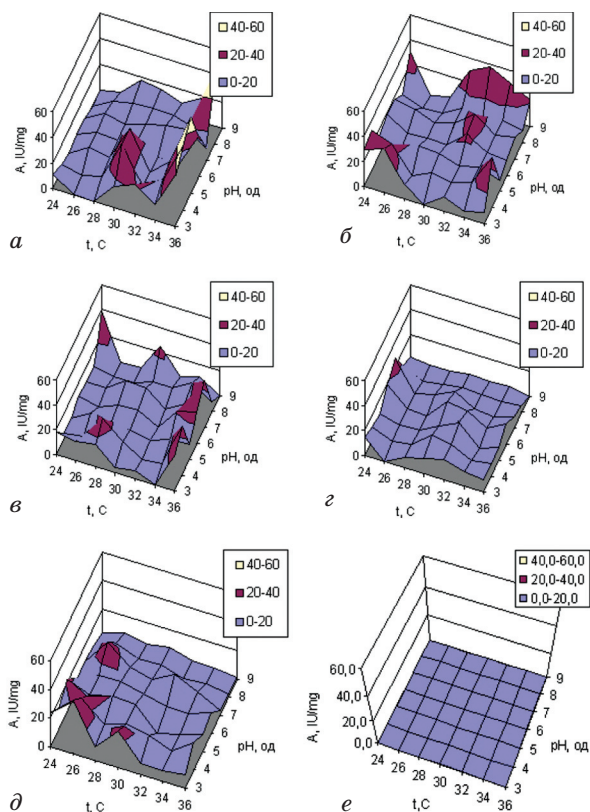


Рис. 4. Питома ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

на живильному середовищі з рН 5 за температури 32 °С на 7-му добу культивування та на живильному середовищі з рН 7 за темпе-

ратури 24 °С на 14-ту добу вирощування. При цьому зазначені величини максимальної питомої активності ензиму достовірно між собою не відрізнялись.

Максимум питомої ендоглюканазної активності КФ штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* на 7-му добу встановлено на середовищі з рН 7 за температури 24 °С (рис. 3, д). При цьому значення ендоглюканазної активності штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* в 17,98 раз перевищувало неоптимізовану величину, визначену на попередньому етапі. Питома активність КФ цього штаму до Na-КМЦ на 14-ту добу культивування була нижчою порівняно з питомою ендоглюканазною активністю КФ на 7-му добу експерименту (рис. 4, д).

Культуральний фільтрат штаму J-2An *P. rotaceus* як на 7-му (рис. 3, е), так і на 14-ту (рис. 4, е) добу вирощування питомої ендоглюканазної активності не виявляв.

Таким чином, у результаті проведеної роботи встановлено оптимальні значення рН живильного середовища і температури культивування для синтезу екзоцелюлаз дослідженими базидіоміцетами. Для отримання найбільшого виходу ендоглюканаз, здатних до гідролізу Na-КМЦ, штами А-Дон-02 *I. lacteus*, Sh-1 *S. hirsutum* та AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* слід культивувати на живильних середовищах з рН 7 за температури 24 °С, штам Д-1 *I. lacteus* — на живильному середовищі з рН 7 за 36 °С, а штам К-1 *I. lacteus* — на живильному середовищі з рН 7 за 34 °С.

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

### ЛІТЕРАТУРА

1. Кузьмінський Є. В., Гвоздик П. І., Голуб Н. В. Біопаливні елементи — проблеми і перспективи розвитку. І. Ферментні паливні елементи // Мікробіол. біотехнол. — 2008. — № 3. — С. 21–31.
2. Сибірний А. Біопаливний етанол з лігноцелюлози (рослинної біомаси): досягнення, проблеми, перспективи // Вісн. НАН України. — 2006. — № 3. — С. 32–48.
3. Кухар В. П. Біоресурси — потенційна сировина для промислового органічного синтезу // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 12–27.
4. Михайлова Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии — Мн.: Бел. наука, 2007 — 407 с.
5. Xing-hua L., Hua-jun Y., Bhaskar R. et al. The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization // Afr. J. Biotechnol. — 2009. — V. 8 (11). — P. 2418–2422.
6. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих

7. Ферментные системы высших базидиомицетов / Под ред. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
8. 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.
9. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
10. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.
11. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity // Pure & Appl. Chem. — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
12. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars // J. Biol. Chem. — 1944. — V. 153, N 2. — P. 375–379.

13. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
14. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посіб. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
15. Комарницкий И. К. Изучение целлюлозолитических ферментов у некоторых дере-

- воразрушающих грибов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1975. — 28 с.
16. Рабинович М. Л., Мельник М. С. Прогресс в изучении целлюлозолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Усп. биол. химии. — 2000. — Т. 40. — С. 205–266.

## ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАЗИДИОМИЦЕТОВ — АКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ.

### II. ЭНДОГЛЮКАНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К Na-CАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ

К. Г. Древалъ

Донецкий национальный университет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Проведен подбор условий культивирования базидиомицетов — активных продуцентов целлюлаз по факторам pH питательной среды (градации фактора изменялись от 3 до 9 pH с шагом 1 ед) и температуры (значения изменялись от 24 °C до 36 °C с шагом 2 °C) с целью повышения синтеза ими эндоглюканаза (КФ 3.2.1.4). Энзиматическую активность определяли по отношению к Na-карбоксиметилцеллюлозе. Установлено, что оптимальной начальной кислотностью питательной среды для всех штаммов является pH 7, а температурой культивирования — 24 °C для штаммов А-Дон-02 *Irpex lacteus*, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, Sh-1 *Stereum hirsutum*, 34 °C для К-1 *Irpex lacteus* и 36 °C для Д-1 *Irpex lacteus*. В результате подбора условий культивирования значения эндоглюканазной активности возросли в 1,59 раза для штамма Sh-1 *Stereum hirsutum*, в 2,51 раза для А-Дон-02 *Irpex lacteus*, в 3,02 раза для К-1 *Irpex lacteus*, в 3,69 раза для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* и в 12,16 раза для Д-1 *Irpex lacteus*. В то же время в результате оптимизации условий культивирования удельная эндоглюканазная активность штамма К-1 *Irpex lacteus* возросла в 3,54 раза, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — в 5,12 раза, Д-1 *Irpex lacteus* — в 7,86 раза и AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — в 17,98 раза. Штамм J-2An *Phellinus pomaceus* не проявил эндоглюканазной активности ни в одном варианте опыта. Максимальная активность эндоглюканаза относительно Na-карбоксиметилцеллюлозы для культур К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* и AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* установлена на 7-е сут культивирования, в то время как для культуры Sh-1 *S. hirsutum* — на 14-е сут эксперимента.

**Ключевые слова:** базидиомицеты, эндоглюканаза, Na-карбоксиметилцеллюлоза, температура культивирования, кислотность среды, оптимизация, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.

## SELECTION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR BASIDIOMYCETES — ACTIVE PRODUCERS OF CELLULOLYTIC ENZYMES.

### II. ENDOGLUCANASE ACTIVITY OF CULTURAL LIQUIDS TOWARDS Na-CARBOXYMETHYLCELLULOSE

K. G. Dreval

Donetsk National University

E-mail: k.dreval@gmail.com

To increase endoglucanase (EC 3.2.1.4) production, selection of the cultivation conditions of basidiomycetes — active cellulolytic enzymes producers — was conducted along nutrient medium initial acidity (factor was changed between 3 and 9 pH with 1 pH step) and cultivation temperature (factor was changed between 24 and 36 °C with a step of 2 °C). Endoglucanase activity towards Na-carboxymethylcellulose was determined in the selection process. It was determined that optimal initial acidity of the nutrient medium for all strains was 7 pH, and cultivation temperature was 24 °C for the strains А-Дон-02 *Irpex lacteus*, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, Sh-1 *Stereum hirsutum*, 34 °C for the strain К-1 *Irpex lacteus* and 36 °C for the strain Д-1 *Irpex lacteus*. As the result of optimization, the values of endoglucanase activity increased at 1,59 times for the strain Sh-1 *Stereum hirsutum*, at 2,51 times for the strain А-Дон-02 *Irpex lacteus*, at 3,02 times for the strain К-1 *Irpex lacteus*, at 3,69 times for the the strain AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* and at 12,16 times for the strain Д-1 *Irpex lacteus*. At the same time, as the result of selection of cultivation conditions, specific endoglucanase activity of strain К-1 *Irpex lacteus* was increased at 3,54 times, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — at 5,12 times, Д-1 *Irpex lacteus* — at 7,86 times and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — at 17,98 times. Culture J-2An *Phellinus pomaceus* shown absence of endoglucanase activity in any experiment. Maximal endoglucanase activity of enzymes in cultural liquids of strains К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* and AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* was established on the 7<sup>th</sup> day of cultivation, and for strain Sh-1 *S. hirsutum* — on the 14<sup>th</sup> day of the experiment.

**Key words:** basidiomycetes, endoglucanase, Na-carboxymethylcellulose, cultivation temperature, acidity of nutrient medium, optimization, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.