

КУЛЬТИВУВАННЯ БАЗИДИОМІЦЕТІВ — АКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ. ІV. ЦЕЛОБІАЗНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ФІЛЬТРАТИВ БАЗИДИОМІЦЕТІВ

К. Г. Древалъ
М. І. Бойко

Донецький національний університет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Отримано 25.10.2011

Проведено підбір умов культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлаз — за зміною рН живильного середовища (від 3 до 9 рН з інтервалом 1 од) і температури (значення змінювались від 24 °С до 36 °С з інтервалом 2 °С) з метою збільшення синтезу ними целобіази (КФ 3.2.1.21). Ензиматичну активність визначали стосовно целобіози. Встановлено, що оптимальною початковою кислотністю живильного середовища для штамів Д-1, А-Дон-02 *Irpex lacteus* є рН 3, для Sh-1 *Stereum hirsutum* — рН 5, для К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — рН 6; оптимальною температурою культивування — 26 °С для штаму К-1 *Irpex lacteus*, 28 °С — для Д-1 *Irpex lacteus*, 30 °С — для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* та 32 °С — для штамів А-Дон-02 *Irpex lacteus* і Sh-1 *Stereum hirsutum*. У результаті підбору умов культивування значення целобіазної активності зросли в 1,11 раза для штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* та в 3,82 раза — для К-1 *Irpex lacteus*. Водночас унаслідок оптимізації умов культивування питома целобіазна активність штаму Д-1 *Irpex lacteus* зросла в 1,31 раза, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — в 1,78 раза, К-1 *Irpex lacteus* — у 2,67 раза та штаму AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — у 2,79 раза. Штам J-2An *Phellinus pomaceus* не виявив активності целобіази в жодному варіанті дослідження. Максимальну целобіазну активність для культур Д-1 *Irpex lacteus* та Sh-1 *Stereum hirsutum* встановлено на 7-му добу культивування, а для культур К-1, А-Дон-02 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — на 14-ту добу експерименту.

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

Целюлозолітичні ензими набули широкого практичного застосування [1–3]. Та найчастіше їх застосовують у процесі гідролізу целюлози з метою отримання глюкози, яка може бути використана для виробництва палива, їжі або різноманітних хімічних сполук [3, 4]. Найвитратнішою ланкою у процесі біоконверсії целюлози є целюлозолітичні ензими [4].

Паралельно з пошуком нових активних продуцентів целюлаз актуальним є питання дослідження їхніх фізіолого-біохімічних характеристик, особливо якщо штамми вперше досліджують як продуценти целюлозолітичних ензимів. У попередніх роботах нами відібрано нові штамми базидіальних грибів, здатних до активного синтезу целюлаз та доведено перспективність їх подальшого дослідження [5].

Для підвищення біологічної продуктивності грибів-продуцентів, а відповідно і рентабельності виробництва, використовують оптимальну біотехнологію, тобто здійснюють культивування в таких умовах, за яких спадковий потенціал організму буде виявлятися на найвищому рівні, що сприятиме більшому виходу продукту. Саме тому одним з методів підвищення синтезу целюлаз організмами-продуцентами є оптимізація умов їх культивування. Раніше нами досліджено вплив температури культивування та початкової кислотності живильного середовища на загальну целюлозолітичну та ендоглюканазну активність базидіоміцетів, унаслідок чого істотно підвищено вихід цих ензимів у живильне середовище [6, 7]. Така сама робота має бути проведена і для целобіази (β -глюкозидази), оскільки вона є одним із най-

важливіших ензимів у складі целюлозолітичного комплексу унаслідок регуляції рівня проміжної целобіози та через неї — активності целобіогідролаз та ендоглюканаз [8]. Актуальність проведення такого дослідження також зумовлена відсутністю даних літератури стосовно целобіазної активності базидіоміцетів залежно від умов культивування та недостатньою вивченістю залежності синтезу базидіоміцетами целобіазних ензимів від температури культивування і початкової кислотності живильного середовища.

Метою роботи було визначення оптимальних значень температури та рН живильного середовища для культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів для підвищення синтезу ними целобіаз.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були 6 штамів вищих базидіальних грибів: К-1, А-Дон-02 і 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 целобіазної 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 [9]. Початкову кислотність живильного середовища доводили до значень від 3 до 9 з кроком 1 рН за допомогою 10%-х розчинів HCl або NaOH на аналізаторі іонів АІ-123 (Україна). Культивування проводили протягом 14 діб за температури від 24 до 36 °С з інтервалом 2 °С в термостабах ТС-80 і ТС-80-М2 (Росія). Як єдине джерело вуглецю до середовища додавали фільтрувальний папір Whatman № 1 у кількості 8 г/л.

Целобіазну активність (ЦА) культуральних фільтратів (КФ) базидіоміцетів визначали стосовно целобіози (Sigma, Німеччина). Склад реакційних сумішей та умови проведення реакцій відповідали рекомендаціям ІУРАС [10] і загальноприйнятим методикам [11, 12]. Обчислюючи результати, за одиницю активності (ІУ) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкмоль глюкози протягом 1 хв в умовах досліду ($t = 40$ °С, $\text{pH} = 4,8$). Питому активність (ІУ/mg) знаходили за відношенням загальної активності культурального фільтрату (ІУ/ml) до вмісту протеїнів у ньому (mg/ml). Глюкозу визначали глюксооксидазно-пероксидазним методом з використанням набору реак-

тивів для визначення глюкози у біологічних рідинах («Реагент», Україна). 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

Результати дослідження ЦА КФ базидіоміцетів на 7-му добу експерименту подано на рис. 1, а на 14-ту добу — на рис. 2. З рис. 1, а видно, що ЦА КФ штаму К-1 *I. lacteus* на 7-му добу культивування має дві оптимальні зони за умов дії різних градацій фізико-хімічних факторів: першу — за низьких температур на середовищі зі слаболужною реакцією ($t = 24$ °С, $\text{pH} = 7-8$ од) і другу — при високих температурах за кислої/слабокислої реакції середовища ($t = 32-34$ °С, $\text{pH} = 3-6$ од). Водночас, на 14-ту добу культивування штаму визначено вже три зони максимальної ЦА за дії різних значень температури та рН середовища (рис. 2, а). Вони знаходяться в ділянці дії низьких температур (до 30 °С) за умов 6–8 од рН середовища. На 14-ту добу культивування ЦА КФ штаму К-1 *I. lacteus* вища порівняно з даними, отриманими на 7-му добу експерименту. Абсолютний максимум ЦА КФ цієї культури встановлено за температури 26 °С на середовищі з початковим значенням рН 6 на 14-ту добу культивування (рис. 2, а). Отримана величина ЦА перевищувала неоптимізоване значення у 3,82 раза.

Штам А-Дон-02 *I. lacteus* також характеризувався тим, що на 14-ту добу культивування ЦА його КФ зростала порівняно зі значеннями на 7-му добу експерименту. Однак на 7-й день експерименту виявляли лише одну зону оптимальної дії температури та рН живильного середовища (рис. 1, б), а на 14-й — дві (рис. 2, б). Максимум ЦА КФ цього штаму також визначено на 14-ту добу культивування за умов вирощування культури А-Дон-02 *I. lacteus* на середовищі з рН 3 при температурі 32 °С на 14 добу експерименту. Оптимізоване значення ЦА цієї культури в 1,11 раза перевищувало неоптимізоване.

Для культури Д-1 *I. lacteus* на 7-й день культивування встановлено неоднозначність оптимальних зон дії температури та рН середовища (рис. 1, в), що, можливо, пов'язано з наявністю у КФ цього штаму кількох ізоформ целобіаз, які характеризуються

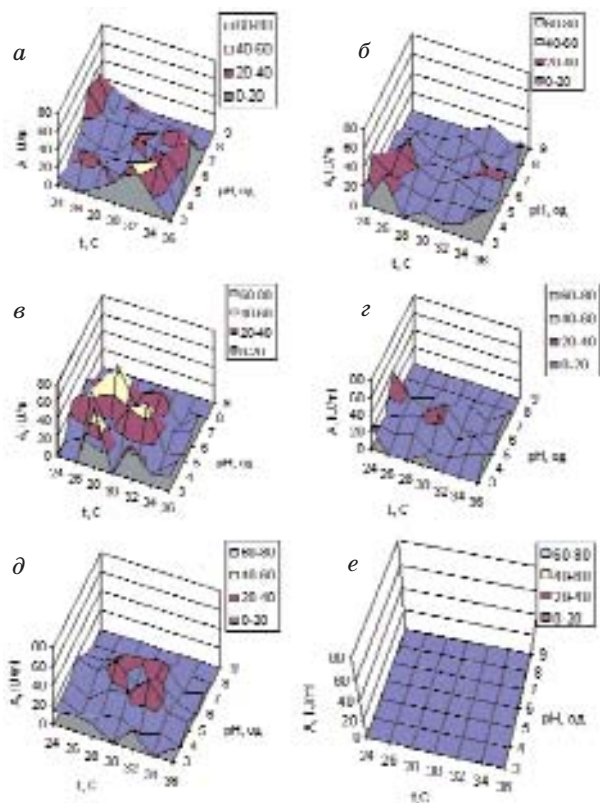


Рис. 1. Целобіазна активність ензимів культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* (а, б і в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) і J-2An *Phellinus rotameus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту (тут і далі у вставках наведено інтервали целобіазної активності)

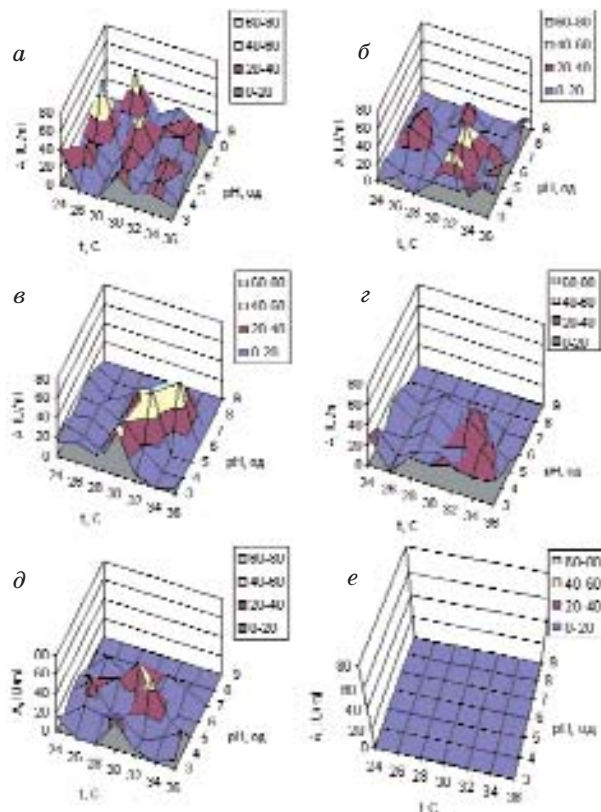


Рис. 2. Целобіазна активність ензимів культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* (а, б і в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) і J-2An *Phellinus rotameus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

різними оптимумами дії й частково перебиваються у цьому експерименті. Водночас, на 14-ту добу експерименту для штаму Д-1 *I. lacteus* характерна наявність лише однієї, чіткої, але досить широкої зони високої ЦА (рис. 2, в). Максимальну ЦА КФ цієї культури встановлено: на 7-му добу експерименту — за температури 28 °С на середовищі з рН 3 та 6, на 14-ту добу — за температури 32 °С на середовищі з рН 5 (неоптимізоване значення) та 34 °С — на середовищі з рН 6. Усі вказані значення максимальної ЦА штаму Д-1 *I. lacteus* достовірно між собою не відрізняються.

ЦА КФ культури Sh-1 *S. hirsutum* як на 7-му (рис. 1, г), так і на 14-ту (рис. 2, г) добу культивування достовірно нижча порівняно з іншими культурами. Вияв активності стосовно целобіози у цієї культури спостерігали за умов культивування на живильних середовищах з рН не вище 7 од. Високі значення ЦА КФ на 7-му добу експерименту визначено за температур не вище 30 °С, а на 14-ту добу експерименту, навпаки, — не нижче 30 °С. Слід зазначити, що впродовж усього

терміну культивування цього штаму зберігався пік ЦА за температури 24 °С на середовищі з рН 3 од. Максимальне значення ЦА КФ штаму Sh-1 *S. hirsutum*, встановлене на 7-му добу культивування на середовищі з рН 6 за температури 24 °С, достовірно не відрізнялось від активності, отриманої за неоптимізованих умов культивування на 14-ту добу експерименту.

Для культури AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* було характерним збереження зони високої ЦА із 7-ї (рис. 1, д) до 14-ї (рис. 2, д) доби експерименту. На 14-ту добу культивування ЦА КФ цього штаму вища порівняно із ЦА культури на 7-му добу експерименту. Максимальне значення ЦА, встановлене в експерименті на 14-ту добу за температури 30 °С на середовищі з рН 6, у межах похибки знаходиться на одному рівні з неоптимізованим значенням ЦА штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

ЦА КФ культури J-2An *P. rotameus* за умов дії різних градацій рН середовища і температури не виявлено в усіх варіантах дослідження (рис. 1, е та 2, е). Зважаючи на нормальний

ріст штаму в 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 ЦА у штаму J-2An *P. rotaceus* на попередньому етапі досліджень можна розглядати як артефакт, адже дані не відтворено за повторного проведення експерименту. Окрім того, втрату здатності цього штаму до гідролізу целобіози можна пояснити перебудовою ензиматичного апарату гриба після введення його в культуру.

Паралельно з дослідженням целобіазної активності визначали питому целобіазну активність (ПЦА); результати досліджень на 7-му та 14-ту добу культивування наведено на рис. 3 і 4 відповідно. Загалом залежність ПЦА від дії рН середовища і температури схожа із залежністю ЦА, однак має низку особливостей. Так, для штаму К-1 *I. lacteus* на 7-му добу експерименту краще виявляються дві зони високої ПЦА (рис. 3, а), а на 14-ту добу культивування (рис. 4, а) можна чітко побачити три зони високої ПЦА КФ

з мінімумами за культивування при 28 та 32 °С. Абсолютний максимум ПЦА встановлено за тих самих умов, що й для ЦА, проте оптимізоване значення ПЦА перевищує неоптимізований показник у 2,67 раза.

Штам А-Дон-02 *I. lacteus* виявляв меншу ПЦА порівняно зі штамом К-1 *I. lacteus*, що пояснюється більшим накопиченням протеїну цією культурою. На відміну від ПЦА КФ, визначеної на 7-й день експерименту (рис. 3, б), на 14-й день висока ПЦА мала вияв за культивування на живильних середовищах з рН не вище 6 од (рис. 4, б). Абсолютне максимальне значення ПЦА КФ штаму А-Дон-02 *I. lacteus*, встановлене за культивування його на середовищі з початковою кислотністю рН 3 при температурі 32 °С, перевищує неоптимізоване значення ПЦА в 1,78 раза.

Для штаму Д-1 *I. lacteus* на 7-му добу культивування за температури 28 °С на живильному середовищі з рН 3 встановлено абсолютний максимум ПЦА не тільки для цієї культури, але й порівняно з усіма іншими досліджуваними штамми. При цьому, на відміну від

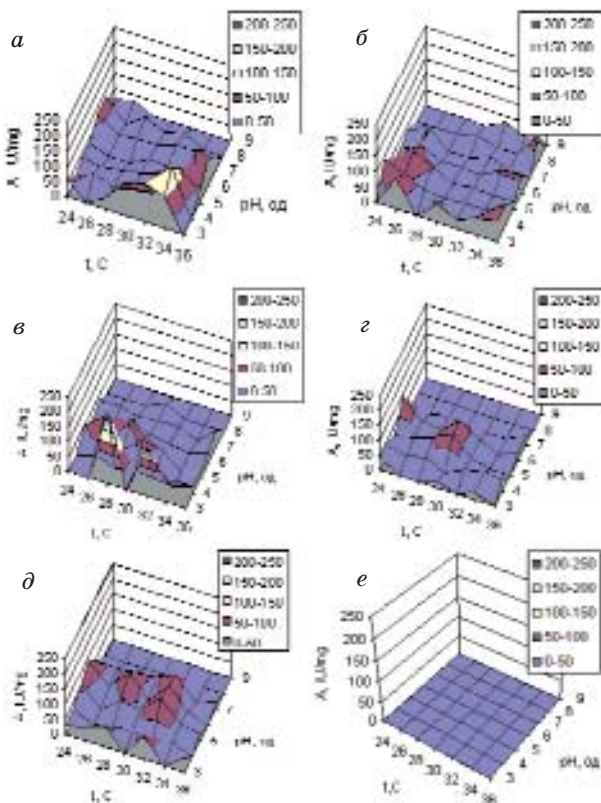


Рис. 3. Питому целобіазну активність ензимів культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* (а, б і в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) і J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту

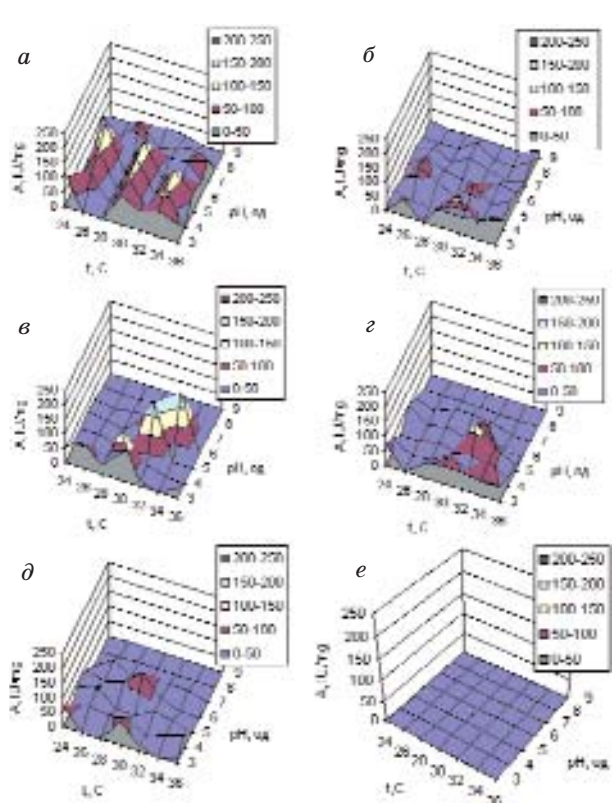


Рис. 4. Питому целобіазну активність ензимів культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* (а, б і в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) і J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

ЦА, на 7-й день експерименту визначено лише 2 чіткі піки ПЦА (рис. 3, в). На 14-й день культивування зона оптимуму за дії цих факторів майже збігалася з оптимальною зоною для ЦА цієї культури аналогічного віку, однак була дещо розділена через відсутність ПЦА КФ за культивування на середовищі з рН 4 (рис. 4, в). Оптимізоване значення ПЦА КФ штаму Д-1 *I. lacteus* перевищувало неоптимізований показник в 1,31 раза.

Так само, як і ЦА КФ штаму Sh-1 *S. hirsutum*, його ПЦА була найменшою порівняно з іншими культурами і відзначалась чіткими значеннями оптимальних зон дії початкової рН живильного середовища та температури культивування як на 7-му (рис. 3, г), так і на 14-ту (рис. 4, г) добу культивування. Якщо максимальна ЦА КФ цього штаму достовірно не відрізнялась від неоптимізованого значення, то оптимізоване значення ПЦА КФ штаму Sh-1 *S. hirsutum* було нижчим за аналогічний неоптимізований показник на 24%.

Зона оптимальної дії температури і рН середовища для ПЦА штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* на 7-му добу експерименту характеризувалась чітким визначенням трьох ділянок (рис. 3, д), а на 14-ту добу була нижчою порівняно із зоною оптимуму ЦА цієї культури аналогічного віку (рис. 4, д). Абсолютний максимум ПЦА КФ цього штаму на 14-ту добу експерименту встановлено за культивування на середовищі з початковою кислотністю рН 6 за температури 30 °С. Відмінність культури AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* від інших штамів полягала в

тому, що максимальне оптимізоване значення її ЦА достовірно від неоптимізованого не відрізнялось, а максимальна ПЦА КФ цього штаму за оптимізованих умов культивування перевищувала неоптимізоване значення у 2,79 раза. Це можна пояснити високою специфічністю протеїнових сполук, що синтезувалися штамом AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* за таких умов культивування.

На рис. 3, е та 4, е показано, що як на 7-му, так і на 14-ту добу культивування ПЦА КФ штаму J-2An *P. rotaceus* не виявлено.

Таким чином, у результаті проведеної роботи встановлено, що штами К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus*, Sh-1 *Stereum hirsutum* і AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* здатні до синтезу целобіаз. Для прояву максимальної активності целобіаз базидіальні гриби слід культивувати за таких умов: штам К-1 *I. lacteus* — на середовищі з початковим рН 6 за температури 26 °С; А-Дон-02 *I. lacteus* — на середовищі з рН 3, 32 °С; Д-1 *I. lacteus* — на середовищі з рН 3, 28 °С; Sh-1 *S. hirsutum* — на середовищі з рН 5, 32 °С, а штам AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — на середовищі з рН 6 за температури 30 °С. При цьому максимальна целобіазна активність для культур Д-1 *I. lacteus* та Sh-1 *S. hirsutum* припадає на 7-му добу культивування, а для К-1, А-Дон-02 *I. lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — на 14-ту.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Адаменко О., Височанський В., Лютко В. та ін. Альтернативні палива та інші нетрадиційні джерела енергії. — Івано-Франківськ: ІМЕ, 2001. — 428 с.
2. Bhat M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // *Biotech. Adv.* — 2000. — N 18. — P. 355–383.
3. Xing-hua L., Hua-jun Y., Bhaskar R. et al. The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization // *Afr. J. Biotech.* — 2009. — V. 8 (11). — P. 2418–2422.
4. Xiao-Bin Yu, Joo-Heon Nam, Huyn Shik Yun et al. Optimization of cellulase production in batch fermentation by *Trichoderma reesei* // *Biotech. Bioproc. Eng.* — 1998. — N 3. — P. 44–47.
5. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
6. Древаль К. Г., Бойко М. І. Культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів. I. Загальна целюлозолітична активність культуральних фільтратів базидіоміцетів // *Біотехнологія.* — 2012. — Т. 5, № 1. — С. 107–114.
7. Древаль К. Г. Культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів. II. Ендоглюканазна активність культуральних фільтратів базидіоміцетів стосовно Na-карбоксиметилцелюлози // *Біотехнологія.* — 2012. — Т. 5, № 2. — С. 86–91.
8. Квачадзе Л. Л., Квесітадзе Г. И., Клесов А. А. и др. Биоконверсия целлюлозы: микробиология и биохимия // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология.* — 1988. — Т. 11. — 224 с.
9. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.
10. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity // *Pure Appl. Chem.* — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
11. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология.* — 1993. — Т. 25. — 152 с.

12. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособ. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
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.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАЗИДИОМИЦЕТОВ — АКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ. IV. ЦЕЛЛОБИАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

К. Г. Древаль, М. И. Бойко

Донецкий национальный университет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Проведен подбор условий культивирования базидиомицетов — активных продуцентов целлюлаз — по изменению pH питательной среды (от 3 до 9 pH с интервалом 1 ед) и температуры (значения изменялись от 24 °C до 36 °C с интервалом 2 °C) с целью увеличения синтеза ими целлобиазы (КФ 3.2.1.21). Энзиматическую активность определяли относительно целлобиозы. Установлено, что оптимальной начальной кислотностью питательной среды для штаммов Д-1, А-Дон-02 *Irpex lacteus* является pH 3, для Sh-1 *Stereum hirsutum* — pH 5, для К-1 *Irpex lacteus* и AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — pH 6; оптимальной температурой культивирования — 26 °C для штамма К-1 *Irpex lacteus*, 28 °C — для Д-1 *Irpex lacteus*, 30 °C — для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* и 32 °C — для штаммов А-Дон-02 *Irpex lacteus* и Sh-1 *Stereum hirsutum*. В результате подбора условий культивирования значения целлобиазной активности возросли в 1,11 раза для штамма А-Дон-02 *Irpex lacteus* и в 3,82 раза — для К-1 *Irpex lacteus*. В то же время в результате оптимизации условий культивирования удельная целлобиазная активность штамма Д-1 *Irpex lacteus* возросла в 1,31 раза, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — в 1,78 раза, К-1 *Irpex lacteus* — в 2,67 раза и штамма AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — в 2,79 раза. Штамм J-2An *Phellinus pomaceus* не проявил целлобиазной активности ни в одном варианте опыта. Максимальная целлобиазная активность культур Д-1 *Irpex lacteus* и Sh-1 *Stereum hirsutum* установлена на 7-е сут культивирования, а К-1, А-Дон-02 *Irpex lacteus* и AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — на 14-е сут эксперимента.

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

CULTIVATION OF BASIDIOMYCETES, WHICH ARE ACTIVE PRODUCERS OF CELLULOLYTIC ENZYMES. IV. CELLOBIASE ACTIVITY OF BASIDIOMYCETES CULTURAL FILTRATES

K. G. Dreval, M. I. Boyko

Donetsk National University

E-mail: k.dreval@gmail.com

Selection of the cultivation conditions of basidiomycetes, active producers of cellulolytic enzymes, was done along nutrient medium initial acidity (factor was changed between 3 and 9 pH with step 1 pH) and cultivation temperature (factor was changed between 24 and 36 °C with step 2 °C) for the purpose of increasing the synthesis of their cellobiose (EC 3.2.1.21) production. In the selection process enzymatic activity was determined using cellobiose as a substrate. It was determined, that optimal initial acidity of the nutrient medium for strains Д-1, А-Дон-02 *Irpex lacteus* was pH 3, for strain Sh-1 *Stereum hirsutum* — pH 5 and for strains К-1 *Irpex lacteus* and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — pH 6; optimal cultivation temperature was 26 °C for strain К-1 *Irpex lacteus*, 28 °C for strain Д-1 *Irpex lacteus*, 30 °C for strain AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* and 32 °C for strains А-Дон-02 *Irpex lacteus* and Sh-1 *Stereum hirsutum*. As a result of optimization the values of cellobiase activity increased in 1,11 times for strain А-Дон-02 *Irpex lacteus* and in 3,82 times for strain К-1 *Irpex lacteus*. At the same time, as a result of selection of cultivation conditions specific cellobiase activity of strain Д-1 *Irpex lacteus* was increased in 1,31 times, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — in 1,78 times, К-1 *Irpex lacteus* — in 2,67 times and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — in 2,79 times. Culture J-2An *Phellinus pomaceus* showed no cellobiase activity in any experiment. Maximal cellobiase activity of enzymes in cultural liquids of strains Д-1 *Irpex lacteus* and Sh-1 *Stereum hirsutum* was established on the 7th day of cultivation, and for strains К-1, А-Дон-02 *Irpex lacteus* and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — on the 14th day of the experiment.

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