

УДК 577.152.321+663.11

КУЛЬТИВУВАННЯ БАЗИДИОМІЦЕТІВ — АКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ. V. СКЛАД ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ЗА ДЖЕРЕЛАМИ ВУГЛЕЦЮ ТА АЗОТУ

К. Г. Древаль
М. І. Бойко

Донецький національний університет, Донецьк

E-mail: k.dreval@gmail.com

Получено 27.03.2012

Оптимізовано склад живильного середовища за джерелами вуглецю та азоту для прояву максимальної активності ензимів целюлозолітичної дії базидіоміцетів. Встановлено, що серед джерел вуглецю найбільш виражений інгібуючий ефект на активність целюлаз виявляє глюкоза, за культивування на середовищах із дисахаридами базидіоміцети активніше продукують неспецифічну целобіазу, ніж ендоглюканазу. З метою вияву максимальної целюлозолітичної активності базидіоміцети слід культивувати на середовищі з фільтрувальним папером у концентрації 8 г/л. У результаті проведеної роботи з оптимізації складу живильного середовища за джерелом азоту встановлено, що найбільший інгібуючий ефект справляють нітрити та сечовина, а максимальна індукція активності целюлаз відбувається за додавання до живильного середовища нітратів. Оптимальним джерелом азоту для штамів К-1 *Irpex lacteus* є 1,5 г/л нітрату кальцію, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* — 1,5 г/л нітрату амонію, а AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — 1,65 г/л сульфату амонію. Оптимальне співвідношення вуглецю до азоту становить 5,3:1 для штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *I. lacteus* та 4,8:1 для AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Ключові слова: базидіоміцети, целюлозолітичні ензими, склад живильного середовища, вуглець, азот, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.

Необхідність пошуку шляхів економії енергетичних та сировинних ресурсів, які стають дедалі дорожчими та дефіцитними, потребує створення нових безвідходних технологій та розробки високоефективних екологічно безпечних засобів переробки відходів [1–4]. Одним із потенційних джерел сировини та енергії є рослинна біомаса [5]. Біомаса є широко розповсюдженою в усьому світі сировиною, і її можна конвертувати у рідке паливо [3, 6]. Саме тому вона є перспективним джерелом для створення на її основі не нафтових палив [7, 8]. Основна проблема біохімічної конверсії целюлозних субстратів у паливо полягає в необхідності попередньої деструкції клітинної стінки рослин та наступного пертворення целюлози в цукри, які можуть бути конвертовані мікроорганізмами [9–12]. Ефективність процесу їх отримання є критичною для економічної доцільності виробництва біопалива [13, 14]. Здатність базидіоміцетів до синтезу

целюлозолітичних ензимів значно варіює залежно від їх екології, середовища існування, часу знаходження в культурі, складу живильного середовища тощо [15, 16]. Найважливішими елементами, які впливають на утворення продуцентами ензимів, є вуглець та азот [16–20]. Однак не всі форми цих елементів однаково впливають на ріст грибів та синтез ними ензимів [17, 18]. Різні продуценти целюлаз вибірково використовують ті чи інші джерела вуглецю та азоту [15–21]. Саме тому при дослідженні нових штамів — продуцентів целюлозолітичних ензимів украй важливим є оптимізація складу живильних середовищ за показниками вуглецевого та азотного живлення.

Метою роботи було визначення оптимальної концентрації джерел вуглецю та азоту в живильних середовищах для культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були 4 штами вищих базидіальних грибів, що їх на попередніх етапах [22–24] відібрали як активні продуценти целюлозолітичних ензимів: К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt.

Для дослідження целюлозолітичної активності штами культивували на основі рідкого середовища Чапека такого складу (г/л): K_2HPO_4 — 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5, KCl — 0,5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01 [25]. Початкове рН живильного середовища доводили до оптимальних значень для кожного штаму [24] на аналізаторі іонів AI-123 (Україна). Культивування проводили протягом 7 діб [23] за оптимальних для кожного штаму температур [24] у термостатах ТС-80 та ТС-80-М2 (Росія).

Встановлення оптимального джерела вуглецю здійснювали поетапно. На першому етапі як єдине джерело вуглецю до середовища Чапека вносили глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, сорбіт, мікрокристалічну целюлозу або фільтрувальний папір. Базовою концентрацією джерела вуглецю було обрано 6 г/л [25], від цього значення збільшували або зменшували вміст джерела вуглецю в живильному середовищі на 2 г/л. Додавали різні джерела вуглецю в еквівалентній кількості до органічного вуглецю в глюкозі. На цьому етапі відбирали таке джерело вуглецю, за культивування на якому визначали максимальну загальну целюлозолітичну активність. Далі градацію концентрації джерела вуглецю зменшували, і експеримент проводили відносно оптимальної концентрації, встановленої на першому етапі.

Оптимальне джерело азоту та його концентрації в живильному середовищі визначали аналогічно до попередньо описаного дослідю. Основною концентрацією в цьому разі було обрано концентрацію 2 г/л, оскільки саме в такій кількості джерело азоту вносять до стандартного середовища Чапека. Від цього значення концентрації джерела азоту вміст азотовмісної сполуки збільшували або зменшували на 0,5 г/л. Під час проведення дослідю до середовища вносили нітрат натрію, нітрит калію, нітрат амонію, нітрат кальцію, сульфат амонію, сечовину або пептон як єдине джерело азоту. Зазначені сполуки додавали в перерахунку на вміст азоту в нітраті натрію.

Активність ензимів целюлозолітичного комплексу визначали стосовно таких суб-

стратів: фільтрувальний папір (Whatman №1, щільність 80 г/м²) — загальна целюлозолітична активність (ФПА), Na-карбоксиметилцелюлоза (С5678, 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 чітко відповідали рекомендаціям IUPAC [26] та загальноприйнятим методикам [27, 28]. Обчислюючи результати, за одиницю активності (од) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкмоль редуруючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв за стандартних умов. Питому активність (од/мг протеїну) визначали за відношенням загальної активності культурального фільтрату (од/мл) до вмісту протеїну в культуральному фільтраті (мг/мл). Редуруючі цукри визначали методом Шомодї-Нельсона (калібрувальну криву побудовано за глюкозою) [27, 29], а глюкозу — глюкозооксидазно-пероксидазним методом з використанням набору реактивів для визначення глюкози у біологічних рідинах («Реагент», Україна). Вміст протеїну оцінювали спектрофотометрично на СФ-46 (Росія) [30].

Усі дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх арифметичних величин — методом Дункана [31].

Результати та обговорення

За культивування базидіоміцетів на живильних середовищах з різними джерелами вуглецю їх ФПА значно варіювала (рис. 1). Так, у жодному з дослідів не визначено ФПА будь-якого штаму за культивування його на середовищі з глюкозою. Це можна пояснити репресуючою дією цього моносахариду на продукцію целюлаз [19]. На середовищі із сахарозою лише для штаму К-1 *I. lacteus* виявили незначну ФПА (рис. 1, а). Внесення лактози до живильного середовища неоднаково впливало на ФПА базидіоміцетів. Так, загальна целюлазна активність штамів А-Дон-02 та Д-1 *I. lacteus* була незначною і зменшувалась зі зростанням концентрації лактози, для штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* максимум ФПА спостерігався за концентрації лактози 4 г/л, а для штаму К-1 *I. lacteus* було встановлено стале значення ФПА за концентрації лакто-

зи до 6 г/л. Внесення до живильного середовища мікрокристалічної целюлози також справляло неоднозначний ефект на досліджувані штами базидіоміцетів. Цей вуглевод проявляв інгібуючу дію на ФПА штамів А-Дон-02, Д-1 *I. lacteus* та AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*, тимчасом як загальна активність целюлозолітичного комплексу штаму К-1 *I. lacteus* істотно варіювала й досягала достовірного максимуму за концентрації мікрокристалічної целюлози 6 г/л. Найбільш виражений індукуючий ефект на ФПА всіх досліджуваних базидіоміцетів мав фільтрувальний папір. За внесення його до живильного середовища ФПА усіх штамів достовірно змінювалась та досягала максимумів на живильних середовищах з концентрацією 8 г/л (рис. 1). Таку дію фільтрувального паперу можна пояснити високим вмістом у ньому целюлози (до 98%) та відсутністю інших полімерів. Водночас, інгібування синтезу целюлаз базидіоміцетами за культивування їх на середовищах з іншими джерелами вуглецю може бути пов'язано з тим, що вони легко поглинаються міцелієм грибів та використовуються для живлення або з високою специфічністю їх до субстрату.

Отже, абсолютний максимум ФПА серед досліджених культур встановлено для штаму Д-1 *I. lacteus* за культивування на середовищі з фільтрувальним папером у концентрації 8 г/л. Штам К-1 *I. lacteus* порівняно із іншими культурами є найбільш лабільним і здатним до адаптації, оскільки виявляв ФПА за культивування у ширшому діапазоні джерел вуглецю.

Ендоглюканазна активність базидіоміцетів щодо Na-КМЦ також значно залежить від джерела вуглецю у живильному середовищі та його концентрації (рис. 2). Так само, як і в разі дослідження ФПА, визначення Na-КМЦ-активності показало, що глюкоза має найбільш виражений інгібуючий ефект на синтез целюлаз базидіоміцетами. Ендоглюканазна активність щодо Na-КМЦ порівняно з іншими культурами варіативніше змінювалась у штаму К-1 *I. lacteus* (рис. 2, а). Зростання концентрації мальтози, сорбіту або мікрокристалічної целюлози призводило до зменшення ендоглюканазної активності щодо Na-КМЦ штаму К-1 *I. lacteus*. Абсолютний максимум ендоглюканазної активності штаму К-1 *I. lacteus* стосовно Na-КМЦ встановлено на середовищі з мікрокристалічною целюлозою в концентрації 2 г/л.

Так само як і для ФПА, вивчення ендоглюканазної Na-КМЦ-активності дозволило виявити, що штам К-1 *I. lacteus* є найбільш адаптогенним, а його ендоглюканазна активність варіює залежно від якісного та кількісного вмісту джерел вуглецю. Також встановлено, що додавання до середовища глюкози або лактози повністю пригнічує синтез Na-КМЦ-ендоглюканази штамми А-Дон-02, Д-1 *I. lacteus* та AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Аналогічно до попередніх дослідів внесення до живильних середовищ різних джерел вуглецю впливало і на синтез базидіоміцетами ендоглюканази, яка здатна до гідролізу ГЕЦ (рис. 3). Так само виявлено, що штам К-1 *I. lacteus* є найбільш здатним

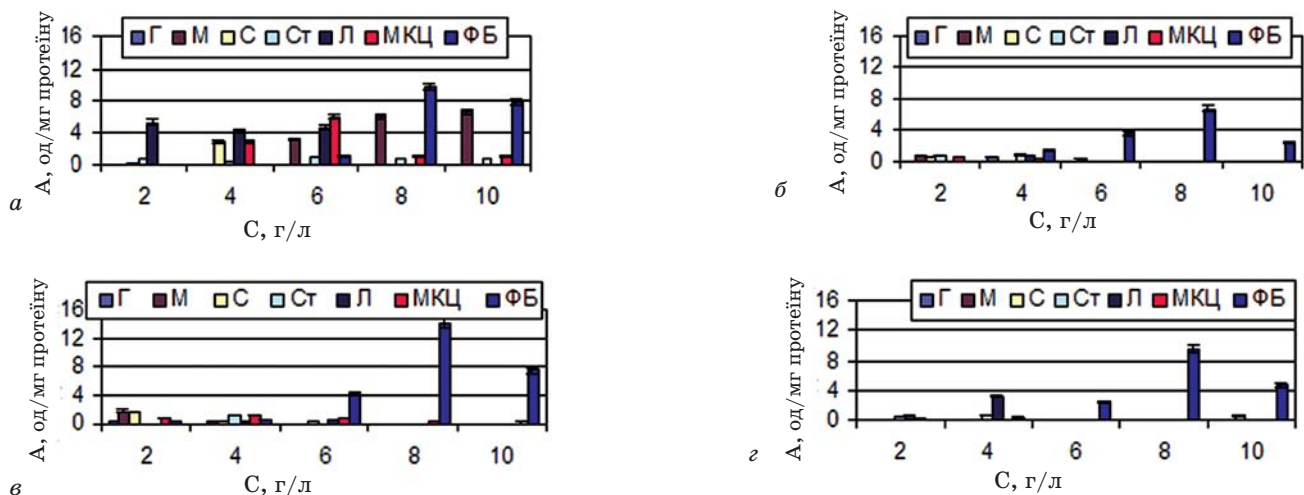


Рис. 1. Загальна целюлозолітична активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) за культивування на живильних середовищах з джерелами вуглецю у зазначеній концентрації

(тут і далі: Г — глюкоза, М — мальтоза, С — сахароза, Ст — сорбіт, Л — лактоза, МКЦ — мікрокристалічна целюлоза, ФБ — фільтрувальний папір)

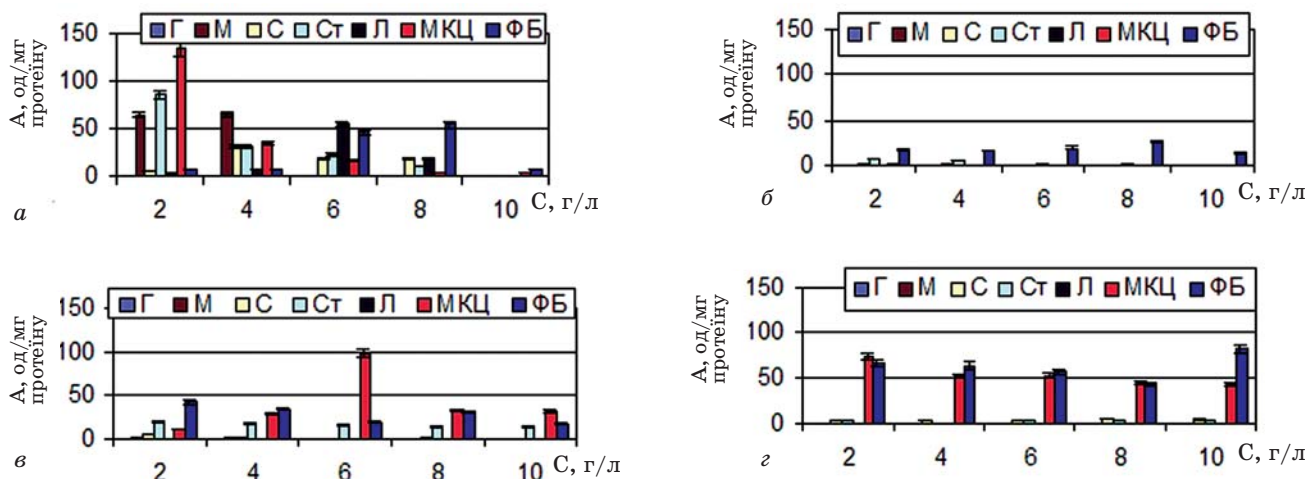


Рис. 2. Ендоглюканазна активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) стосовно Na-карбоксиметилцелюлози за культивування на живильних середовищах з джерелами вуглецю у зазначеній концентрації

до адаптації відповідно до нового джерела вуглецю, що виявляється у варіабельності активності ендоглюканази, специфічної до гідролізу ГЕЦ. У разі внесення до середовища глюкози або лактози спостерігали інгібування синтезу ГЕЦ-специфічної ендоглюканази штамми А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*. Так само, як і для Na-КМЦ-активності, абсолютний максимум активності ГЕЦ встановлено для штаму К-1 *I. lacteus* за культивування на середовищі з мікрокристалічною целюлозою у концентрації 2 г/л.

Целобіазна активність базидіоміцетів найістотніше змінювалась під впливом джерела вуглецю та його концентрації в живильному середовищі (рис. 4). Єдиним субстратом, за культивування на якому не встановлено целобіазної активності, є глюкоза, що пояснюється доступністю цієї речо-

вини для живлення грибів. Одразу для трьох штамів: К-1, Д-1 *I. lacteus* та AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* було виявлено максимальну целобіазну активність, значення якої достовірно між собою не відрізнялись (рис. 4, а; 4, в та 4, г, відповідно). Джерелами вуглецю, за культивування на яких встановлено максимальну целобіазну активність для базидіоміцетів, є мальтоза або сахароза в концентрації 8 або 10 г/л (залежно від штаму). Отже, за культивування на середовищах із цими сполуками зазначені штами синтезували неспецифічну целобіазу, яка здатна гідролізувати як целобіозу, так і мальтозу та сахарозу. Це пояснює відсутність ендоглюканазної активності в попередніх дослідках: для гриба більш енергетично доцільно синтезувати неспецифічну целобіазу, що гідролізуватиме дисахарид у живильному середовищі, ніж нездатну гід-

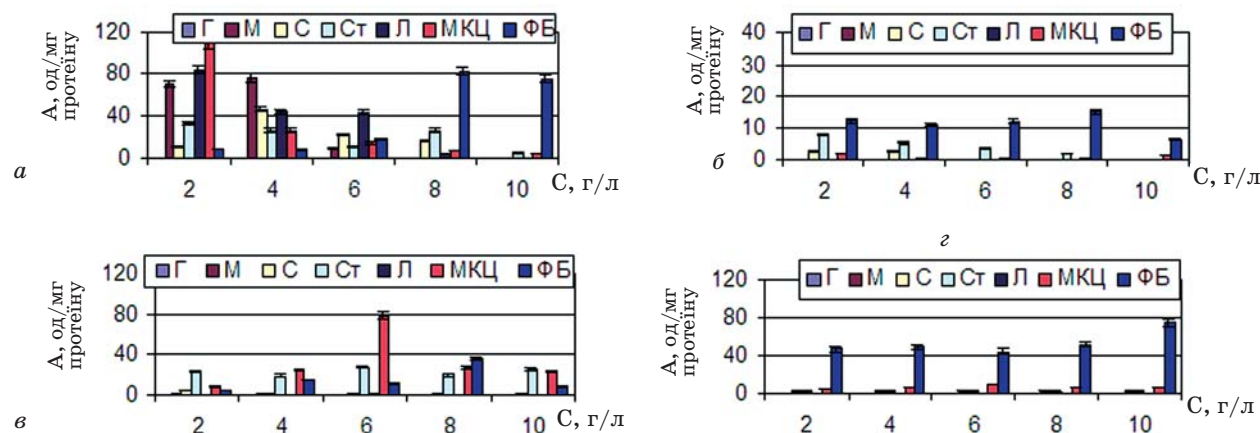


Рис. 3. Ендоглюканазна активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) щодо гідроксіетилцелюлози за культивування на живильних середовищах з джерелами вуглецю у зазначеній концентрації

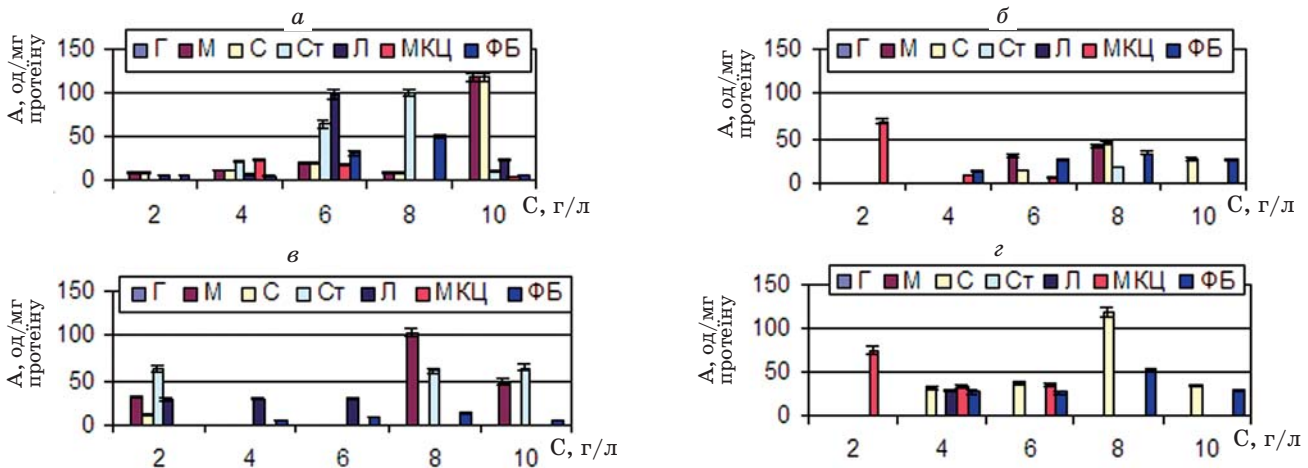


Рис. 4. Целобіазна активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) за культивування на живильних середовищах з джерелами вуглецю у зазначеній концентрації

ролізувати дисахариди внаслідок конфігурації активного центру [28].

Грунтуючись на тому, що найвищу ФПА усіх штамів встановлено за культивування на середовищі з фільтрувальним папером у концентрації 8 г/л, на другому етапі градацію концентрації фільтрувального паперу зменшено і досліджено целюлозолітичну активність у меншому діапазоні концентрацій джерела вуглецю (рис. 5). ФПА усіх штамів базидіоміцетів залишалася найвищою за концентрації фільтрувального паперу в живильному середовищі 8 г/л. Для штамів *Irpex lacteus* максимальні значення інших целюлаз виявлені на середовищах з такою самою концентрацією фільтрувального паперу. Ендоглюканазна активність штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* була максимальною на середовищі з концентрацією фільтрувального паперу 10 г/л, тимчасом як целобіазна активність — 8 г/л.

Таким чином, найбільш виражений інгібуючий вплив на синтез целюлаз базидіоміцетами здійснює глюкоза; за культивування на середовищах із дисахаридами базидіоміцети активніше продукують неспецифічну целобіазу, ніж ендоглюканазу. Для максимальної загальної целюлозолітичної активності досліджувани базидіоміцети слід культивувати на живильному середовищі з фільтрувальним папером у концентрації 8 г/л.

Отримані дані використано для оптимізації живильного середовища за джерелом азоту. Залежність зміни ФПА від джерела азоту та його концентрації в живильному середовищі наведено на рис. 6. Як видно, найбільшою мірою синтез целюлаз базидіо-

міцетами інгібували нітрит калію та сечовина, що можна пояснити токсичною дією на гриби як нітритів, так і сечовини. Як свідчать одержані результати, внесення до живильного середовища нітратів у вигляді солей з будь-якими іонами індукуює синтез базидіоміцетами целюлаз.

Високі значення ФПА за культивування на середовищах з нітратом натрію (2 г/л) та нітратом кальцію (1,5 г/л) було встановлено для штаму К-1 *I. lacteus*. В останньому разі ФПА цього штаму є максимальною (рис. 6, а), що пояснюється стабілізуючою дією іонів кальцію на протеїни. Для синтезу целюлаз штамми А-Дон-02 та Д-1 *I. lacteus* оптимальним є культивування на живильному середовищі з 1,5 г/л нітрату амонію. Це можна пояснити наявністю в живильному середовищі одразу двох форм азоту, доступних для живлення зазначених штамів. Значення ФПА штаму Д-1 *I. lacteus* за культивування на живильному середовищі з 2 г/л нітратом натрію достовірно не відрізнялось від такого на середовищі з 1,5 г/л нітратом амонію. Однак, у другому разі вміст протеїну цього штаму нижчий, що свідчить про позитивний вплив нітрату амонію на синтез целюлаз.

Додавання до живильного середовища будь-якого джерела азоту в кількості вище 2 г/л виявило інгібування ФПА штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*. Найвищу загальну целюлозолітичну активність цього штаму встановлено за культивування на середовищах із сульфатом амонію і нітратом натрію в концентрації 1,5 та 2 г/л відповідно. Однак у першому випадку кількість целюлозу вказаного штаму вища, що підтверджується нижчим вмістом протеїнів

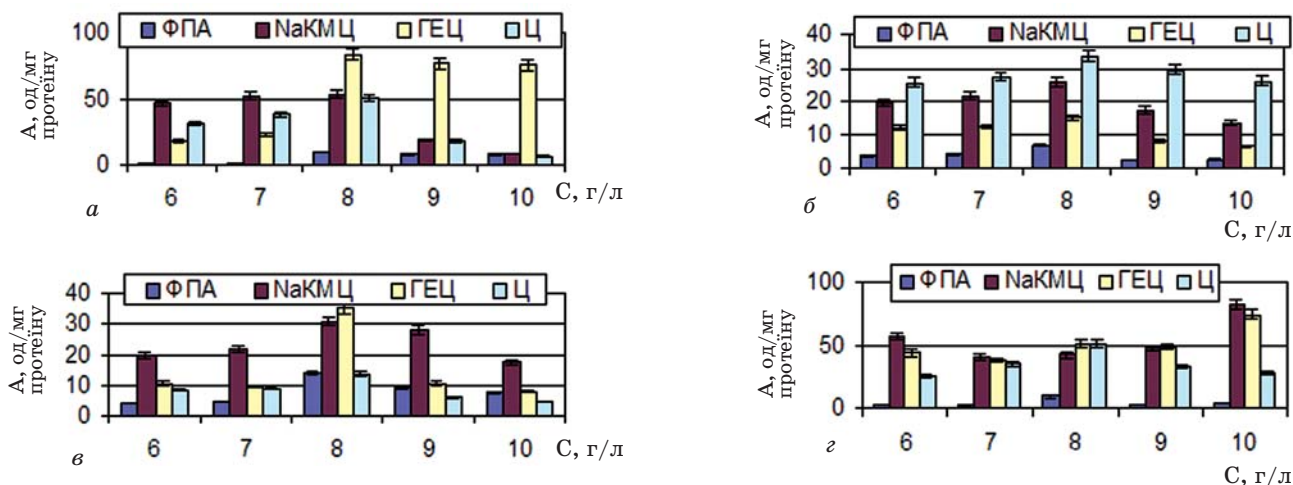


Рис. 5. Целюлозолітична активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) за культивування на живильних середовищах з фільтрувальним папером як єдиним джерелом вуглецю (ФПА — активність щодо фільтрувального паперу, NaKMЦ — ендоглюканазна активність стосовно Na-карбоксиметилцелюлози, GEЦ — ендоглюканазна активність стосовно гідроксіетилцелюлози, Ц — целобіазна активність)

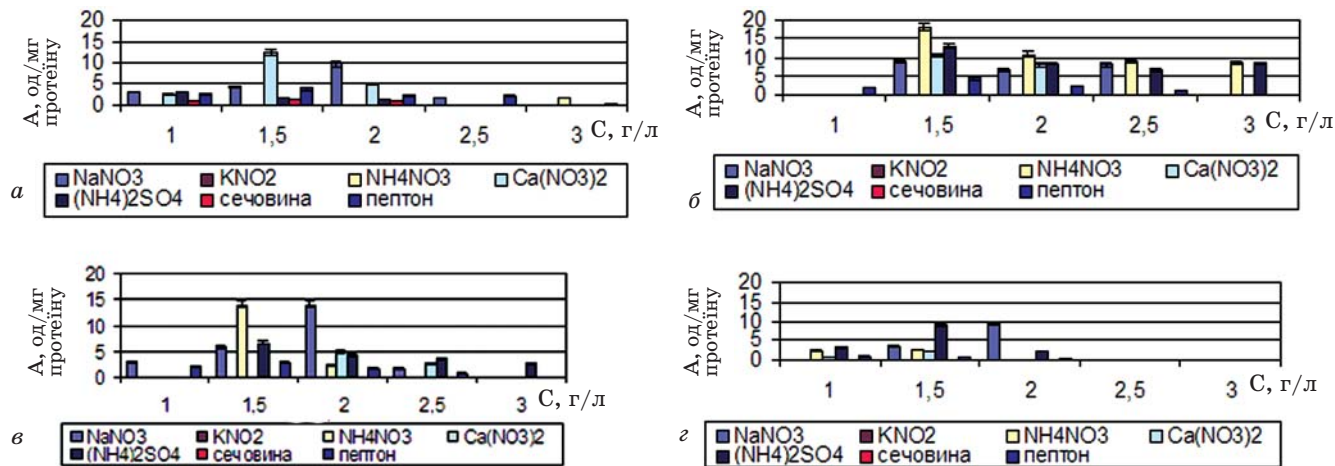


Рис. 6. Загальна целюлозолітична активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) за культивування на живильних середовищах з джерелами азоту в зазначеній концентрації

у КФ. Саме тому додавання до живильного середовища штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* 1,5 г/л сульфату амонію є більш сприятливим для синтезу целюлаз, здатних до гідролізу фільтрувального паперу.

Ендоглюканазна активність базидіоміцетів щодо Na-КМЦ також істотно змінюється залежно від джерела азоту, внесеного до живильного середовища (рис. 7). За культивування на середовищах із сечовиною в концентрації до 2 г/л штами К-1 та Д-1 *I. lacteus* мають Na-КМЦ-активність, причому вона значно більша у К-1 *I. lacteus*, що підтверджує його високу ступінь адаптації до умов культивування. Оптимальне джерело азоту та його концентрація для синтезу базидіомі-

цетами Na-КМЦ-специфічної ендоглюканази лише у штаму К-1 *I. lacteus* збігається з такими для ФПА досліджуваних культур. Це можна пояснити тим, що для гідролізу розчинних похідних целюлози потрібен лише один фермент, тимчасом як для гідролізу нерозчинної целюлози фільтрувального паперу необхідна узгоджена дія низки ферментів, і відсутність або незначна активність одного з них призводить до різкого зменшення ФПА.

Загалом, синтез ендоглюканази, специфічної до Na-КМЦ, штамом А-Дон-02 *I. lacteus* відбувається активніше за внесення до живильного середовища солей амонію, при цьому зростання концентрації джерела

азоту призводить до зниження Na-КМЦ-активності штаму. Ендоглюканаза, специфічна до Na-КМЦ, більш активна у штамі Д-1 *I. lacteus* також на середовищах з амонійними солями, однак максимум такої активності цього штаму визначено за концентрації 1,5 г/л для нітратної солі та 1,5 2 г/л для сульфатної солі (рис. 7, в). Штам AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* має максимальну ендоглюканазну активність щодо Na-КМЦ за культивування на середовищі з 1,5 г/л нітрату амонію.

Залежність ендоглюканазної активності базидіоміцетів щодо ГЕЦ від джерела азоту показано на рис. 8. Залежність, встановлена для активності Na-КМЦ, характерна і для ГЕЦ-активності ендоглюканази штамів виду *I. lacteus*. Лише залежність ендоглюканазної активності щодо ГЕЦ штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* мала певні особливості, що можна пояснити специфічністю синтезованого цим штамом ензиму. Так, максимум його ГЕЦ-активності встановлено на середовищі з нітратом натрію в концентрації 2 г/л. При цьому ГЕЦ-активність цього штаму за культивування на 1,5, 2,5 та 3 г/л нітрату амонію достовірно не відрізнялась.

Варіабельність активності целобіази базидіоміцетів істотно залежала від внесеного джерела азоту та його концентрації (рис. 9). Найбільш виражену інгібуючу дію на синтез целобіази має нітрит калію, а за вирощування штамів грибів на середовищах із сечовиною лише для штаму К-1 *I. lacteus* встановлено незначну целобіазну активність за концентрації цього субстрату 1 г/л.

Внесення пептону до живильного середовища не призводило до індукції синтезу целобіази, що може відбуватись унаслідок впливу пептону на ріст і розвиток гриба, а не на синтез ензимів. Для синтезу штамом К-1 *I. lacteus* целобіази також найбільш сприятливим є 1,5 г/л нітрату кальцію. Максимальну активність целобіази штамів А-Дон-02 та Д-1 *I. lacteus* встановлено за внесення до живильного середовища 1,5 г/л сульфату амонію, а штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* — 1 та 2 г/л нітрату натрію.

Виходячи з того, що максимум ФПА для штаму К-1 *I. lacteus* встановлено за культивування на середовищі з 1,5 г/л нітрату кальцію, штамів А-Дон-02 та Д-1 *I. lacteus* — 1,5 г/л нітрату амонію, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — 1,5 г/л сульфату амонію, на другому етапі оптимізації складу живильного середовища за джерелом азоту дослідження целюлозолітичної активності здійснено в меншому діапазоні концентрацій (рис. 10). Як впливає з рис. 10, на оптимальних джерелах 1,5 г/л азоту *I. lacteus* мають вищу ФПА порівняно з іншими концентраціями. Водночас, внесення цих джерел азоту неоднаково впливає на активність інших ензимів целюлазного комплексу штамми *I. lacteus*. Таку відмінність можна пояснити тим, що через багатостадійність ензиматичних реакцій гідролізу фільтрувального паперу оптимальні умови для кожного ензиму окремо відрізняються від умов, за яких відбувається не лише активний синтез целюлаз, але й синергізм та взаєморегуляція їх дії. Встановлено, що ФПА штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* достовір-

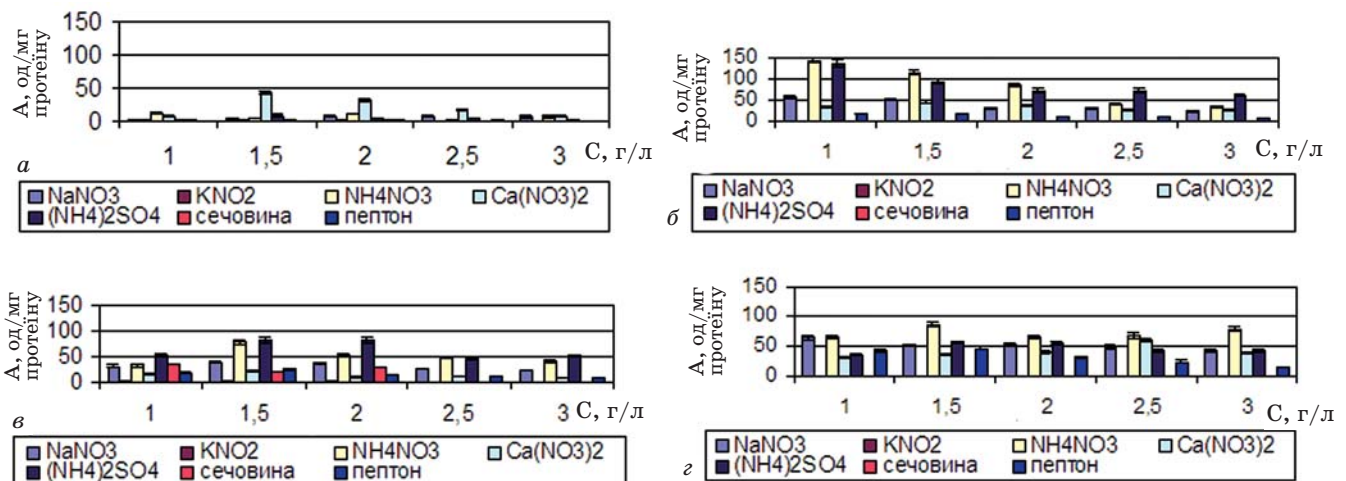


Рис. 7. Ендоглюканазна активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) щодо Na-карбоксиметилцелюлози за культивування на живильних середовищах з джерелами азоту в зазначеній концентрації

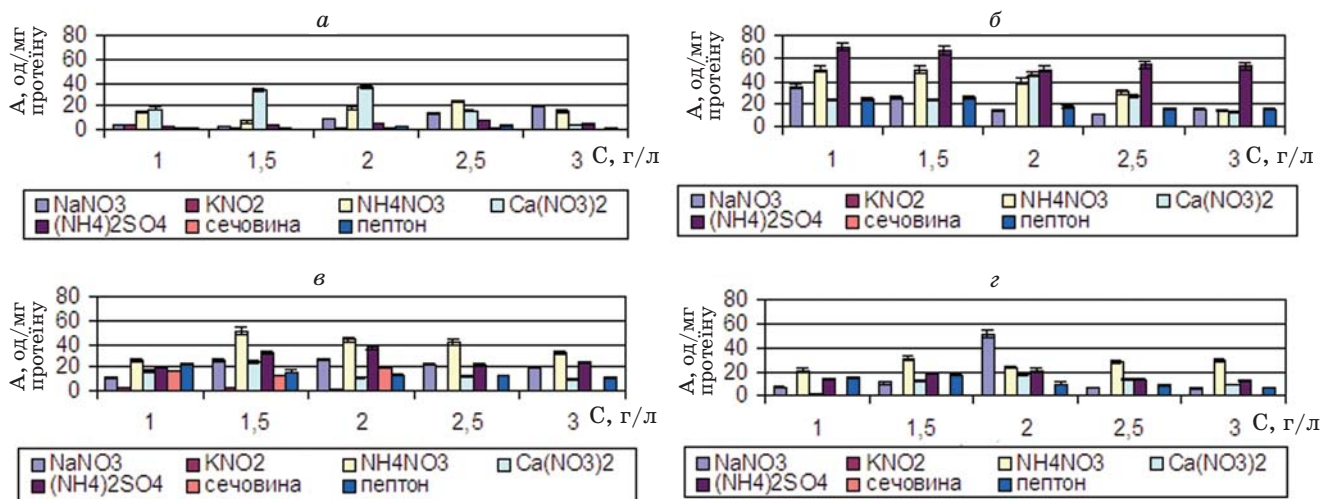


Рис. 8. Ендоглюканазна активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) щодо гідроксіетилцелюлози за культивування на живильних середовищах з джерелами азоту в зазначеній концентрації

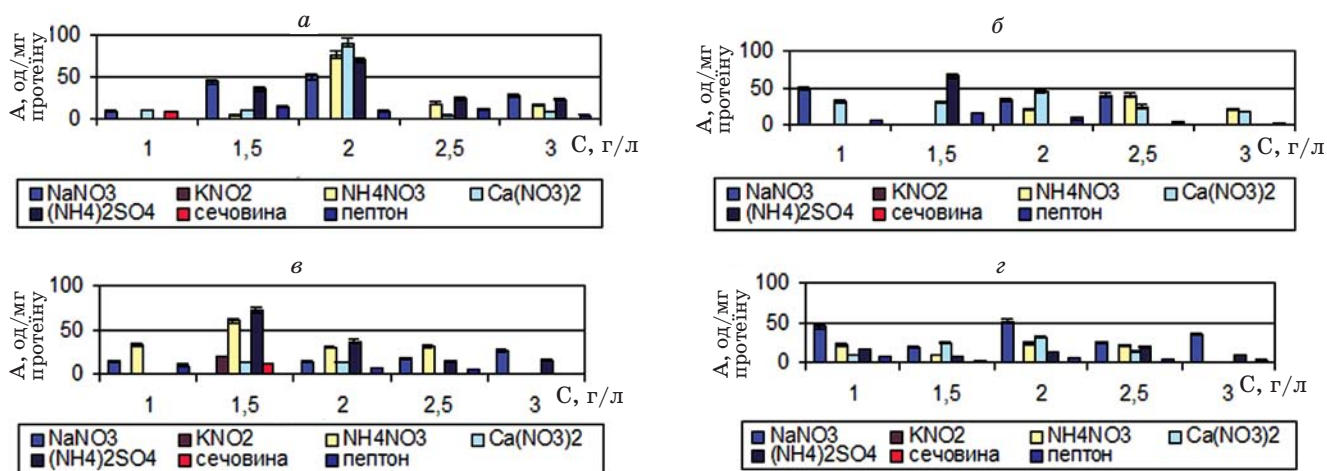


Рис. 9. Целобіазна активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) за культивування на живильних середовищах з джерелами азоту в зазначеній концентрації

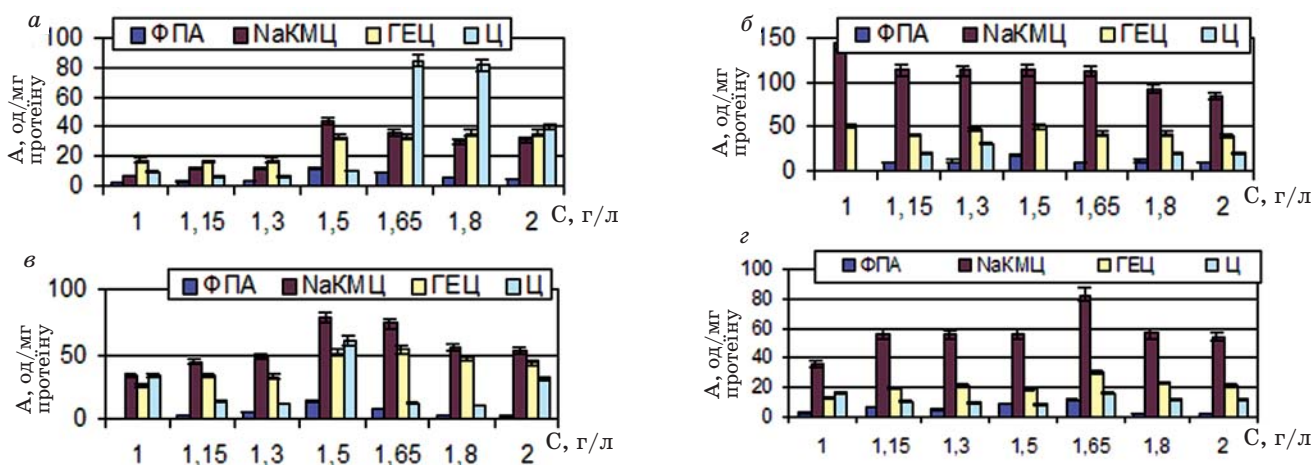


Рис. 10. Целюлозолітична активність штамів К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в) *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (г) за культивування на живильних середовищах з оптимізованими джерелами азоту

но зростає та є максимальною з додаванням 1,65 г/л азоту порівняно з концентрацією 1,5 г/л.

Отже, в результаті проведеної роботи з оптимізації складу живильного середовища за джерелом азоту для активності целюлозолітичних ензимів встановлено, що максимальну інгібуючу дію мають нітрити та сечовина, а індукуючу — нітрати солей. Оптимальним джерелом азоту для целюлозолітичних ензимів штамом К-1 *I. lacteus* є 1,5 г/л нітрату кальцію, А-Дон-02 та Д-1 *I. lacteus* — 1,5 г/л нітрату амонію, а AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* — 1,65 сульфату амонію. Порівнюючи отримані дані з існуючими в літературі, можна зауважити, що вони загалом збігаються. Зокрема, у нечисленних роботах, які стосуються вищих базидіальних грибів [32], вченими встановлено активуючий ефект нітратів амонію на синтез целюлаз, що також корелює з даними

літератури щодо нижчих грибів [21]. Порівняння отриманих результатів з підбору оптимального джерела вуглецевого живлення з даними літератури ускладнено через використання в більшості робіт, присвячених базидіоміцетам [16, 32], природних джерел вуглецю, зокрема деревини різних видів рослин. Однак ученими встановлено активуючий ефект фільтрувального паперу на синтез целюлаз у нижчих грибів [33], що також характерно і для базидіоміцетів, — про це свідчать отримані нами результати.

Встановивши оптимальні джерела вуглецю та азоту, а також їхню концентрацію, можна розрахувати оптимальне співвідношення вуглецю до азоту для целюлаз базидіоміцетів, яке становить 5,3:1 для штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *I. lacteus* і 4,8:1 для штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Роботу проведено за спонсорської підтримки суспільної організації «Развитие» (Росія).

ЛІТЕРАТУРА

1. Баунова М. В., Прочухан Ю. А. Способы утилизации отходов полимеров // Вест. Башкир. унта. — 2008. — Т. 13, № 4. — С. 875–885.
2. Лобачева Г. К., Желтобрюхов В. Ф., Прокопов В. И. и др. Состояние вопроса об отходах и современных способах их переработки: Уч. пособие. — Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2005. — 176 с.
3. Demirbas A. Biorefineries. — London: Springer, 2010. — 336 p.
4. Lichtfouse E. Biodiversity, biofuels, agroforestry and conversation agriculture // Sust. Agricult. Rev. — 2011. — V. 5. — P. 123–148.
5. Gibbons W. R., Hughes S. R. Integrated biorefineries with engineered microbes and high-value co-products for profitable biofuels production // In Vitro Cel. Dev. Biol. — Plant. — 2009. — N 45. — P. 218–228.
6. Gaden E. L. Applications of Biotechnology in Traditional Fermented Food. — Washington: The National Academies Press, 1992. — 208 p.
7. Ladisch M. R. Putting biotechnology to work: bioprocess engineering. — Washington: The National Academies Press, 1992. — 132 p.
8. Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol // J. Biotech. — 1997. — V. 56, N 1. — P. 1–24.
9. Saha B. C. Hemicellulose bioconversion // J. Ind. Microb. Biotech. — 2003. — V. 30. — P. 279–291.
10. Сибірний А. Біопаливний етанол з лігноцелюлози (рослинної біомаси): досягнення, проблеми, перспективи // Вісн. НАН України. — 2006. — № 3. — С. 32–48.
11. Чешкова А. В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха: Уч. пособие для вузов. — Иваново: ГОУВПО ИГХТУ, 2007. — 282 с.
12. Akhtar M., Scott G.M., Swaney R.E. et al. Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation // Resour. Conserv. Recycling. — 2000. — N 28. — P. 241–252.
13. Ramage M. P. Liquid transportation fuels from coal and biomass: technological status, costs, and environmental impacts. — Washington: The National Academies Press, 2009. — 388 p.
14. Shapiro T. H. America's Energy Future: Technology and Transformation. — Washington: The National Academies Press, 2009. — 650 p.
15. Беккер Э. Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд-во МГУ, 1988. — 230 с.
16. Ферментные системы высших базидиомицетов / Под ред. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
17. Tan T. K., Yeoh H. H., Paul K. Cellulolytic activities of *Trichoderma hamatum* grown on different carbon substrates. // MIRCEN J. — 1986. — N 2. — P. 467 — 472.
18. Kyslikova E., Volfova O. Cell growth and cellulase production in *Trichoderma viride* on microcrystalline cellulose // Folia Microbiol. — 1981. — V. 26. — P. 303 — 308.
19. Острикова Н. А., Коновалов С. А. Биосинтез целлюлазы мутантным штаммом *Trichoderma viride* 44 на средах с различными источниками углерода // Прикл. биохим. микробиол. — 1981. — Т. 17, № 6. — С. 854–858.
20. Острикова Н. А., Коновалов С. А. Влияние источников азота на биосинтез целлюлазы мутантным штаммом *Trichoderma viride* 44 // Там же. — 1983. — Т. 19, № 4. — С. 498–502.
21. Саловарова В. П., Грачев Ю. П., Ваганова М. С. Влияние состава питательной среды на биосинтез целлюлозолитических ферментов при глутинном культивировании гриба *Trichoderma longibrachiatum* 7-26 // Там же. — 1978. — Т. 14, № 2. — С. 172–176.
22. Древаль К. Г., Бойко М. И. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
23. Древаль К. Г., Кузнецова К. В., Юдіна А. В. та ін. Динаміка синтезу целюлаз вищими дереворуйнівними базидіальними грибами // Мікробиол. біотехнол. — 2011. — № 4 (16). — С. 52–60.
24. Древаль К. Г., Бойко М. И. Культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів. I. Загальна целюлозолітична активність культуральних фільтратів

- базидиомицетів // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 1. — С. 107–114.
25. Семенов С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. — М.: Агропромиздат, 1990. — 240 с.
26. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity // Pure Appl. Chem. — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
27. 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.
28. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
29. Nelson N. A photometric adaptation of the Shomogyi method for the determination of glucose // J. Biol. Chem. — 1944. — V. 153, N 2. — P. 375 — 379.
30. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
31. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібник. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
32. Elisashvili V., Kachlishvili E., Penninch M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source of Lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes // J. Ind. Microb. Biotech. — 2008. — N35. — P. 1531–1538.
33. Tan T. K., Yeoh H. H., Paul K. Cellulolytic activities of *Trichoderma hamatum* growth on different carbon substrates // MIRCEN. J. — 1986. — N2. — P. 467–472.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАЗИДИОМИЦЕТОВ — АКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ. V. СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПО ИСТОЧНИКАМ УГЛЕРОДА И АЗОТА

К. Г. Древаль, М. И. Бойко

Донецкий национальный университет,
Донецк

E-mail: k.dreval@gmail.com

Оптимизирован состав питательной среды по источникам углерода и азота для проявления максимальной активности энзимов целлюлозолитического действия базидиомицетов. Установлено, что среди источников углерода наиболее выраженный ингибирующий эффект проявляет глюкоза, при культивировании на средах с дисахаридами базидиомицеты активнее продуцируют неспецифическую целлюбиазу, чем эндоглюканазу. Для проявления максимальной целлюлозолитической активности базидиомицеты следует культивировать на среде с фильтровальной бумагой в концентрации 8 г/л. В результате проведенной работы по оптимизации состава питательной среды по источнику азота установлено, что наиболее выраженный ингибирующий эффект проявляют нитриты и мочевины, а максимальная индукция активности целлюлаз происходит при внесении в питательную среду нитратов. Оптимальным источником азота для штамма К-1 *Irpex lacteus* является 1,5 г/л нитрата кальция, А-Дон-02 и Д-1 *Irpex lacteus* — 1,5 г/л нитрата аммония, а AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — 1,65 г/л сульфата аммония. Оптимальным соотношением углерода к азоту для штаммов К-1, А-Дон-02, Д-1 *I. lacteus* является 5,3:1 и 4,8:1 — для штамма AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Ключевые слова: базидиомицеты, целлюлозолитические энзимы, состав питательной среды, углерод, азот, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.

CULTIVATION OF BASIDIOMYCETES WHICH ARE ACTIVE PRODUCERS OF CELLULOLYTIC ENZYMES. V. NUTRIENT MEDIUM ON SOURCES OF CARBON AND NITROGEN

K. G. Dreval, M. I. Boyko

Donetsk National University, Donetsk

E-mail: k.dreval@gmail.com

Nutrient medium composition on sources of carbon and nitrogen for maximal activity of basidiomycetes cellulolytic enzymes has been optimized. It was found that among carbon sources the most pronounced effect on repressing the cellulases activity exhibits glucose. While being cultivated on nutrient mediums with disaccharides, basidiomycetes produced nonspecific cellobiase more than endoglucanase. To receive cultural liquids of basidiomycetes with highest total cellulolytic activity, strains should be cultivated on nutrient mediums containing filter paper as single carbon source in concentration 8 g/l. As a result of culture medium optimization for nitrogen source it was revealed that nitrites and urea display maximal inhibiting effect and maximum induction occurs when nitrates are brought into the culture medium. The best nitrogen source for cellulases activity for К-1 *Irpex lacteus* strain is 1,5 g/l calcium nitrate; А-Дон-02 and Д-1 *Irpex lacteus* are 1,5 g/l ammonium nitrate; and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — 1,65 g/l ammonium sulfate. Optimal ratios of carbon to nitrogen for cellulases activity are 5,3:1 for К-1, А-Дон-02, Д-1 *I. lacteus* strains and 4,8:1 for AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* one.

Key words: basidiomycetes, cellulolytic enzymes, nutrient medium composition, carbon, nitrogen, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.