

# ЗАЛЕЖНІСТЬ АКТИВНОСТІ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ МОНО- ТА ДИКАРІОТИЧНИХ КУЛЬТУР *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray (*Basidiomycetes*) ВІД СУБСТРАТУ

С. М. Бойко  
М. Є. Рязанова

Донецький національний університет, Україна

E-mail: bsm73@ukr.net

Отримано 30.05.2012

Досліджено активність целюлозолітичних ензимів культур *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray, різних за ядерним статусом, залежно від субстрату. Найпродуктивнішими за синтезом ендоглюконаз були монокаріотичні культури Sh1-4 та Sh7-2. Встановлено, що живильне середовище зі вмістом фільтрувального паперу є оптимальним для синтезу целюлаз (культура Sh1-4, максимум целюлозолітичної активності — 319  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , культура Sh7-2 — 101  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ). За культивування на тирсі деревини максимум целюлозолітичної активності у культури Sh1-4 спостерігали на 10-ту добу — 142  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (тирса дуба), у культури Sh7-2 — на 20-ту добу — 34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (тирса ясеня). Дослідження якісного складу целюлозолітичних ензимів дало змогу встановити наявність чотирьох екзоензимів  $C_x$ -комплексу з відносною електрофоретичною рухливістю 0,22; 0,24; 0,47; 0,74. Ензим з відносною електрофоретичною рухливістю 0,47 відзначається високою концентрацією та активністю.

**Ключові слова:** целюлозолітичні ензими, *Stereum hirsutum*, монокаріотичні культури, електрофорез протеїнів.

Сучасним напрямом прикладних мікологічних досліджень є пошук перспективних продуцентів біологічно активних речовин. Науковий досвід свідчить, що дереворуйнівні базидіальні гриби мають лабільну й різноманітну ензиматичну систему, складність якої зумовлена структурою природних субстратів, якими вони живляться. Саме тому в біотехнологічній галузі базидіоміцети розглядають як перспективні продуценти сировини для виробництва харчових добавок, антибіотиків, стероїдів, різних кислот, ріст-активуючих речовин, вітамінів тощо [1]. Ензиматична конверсія рослинної сировини, продукти трансформації якої можна широко застосовувати для одержання продуктів харчування, протеїново-вітамінних концентратів, спиртів, а також як заміники вуглеводного палива, є актуальним питанням сьогодення [2].

До найбільш вивчених целюлаз нижчих грибів належать ензиматичні системи представників родів *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* [3], серед вищих грибів можна відзначити представників родів *Phanerochaete*, *Coriolus*, *Schizophyllum*,

*Irpex*, *Stereum* [1, 4]. Сапротрофні дереворуйнівні гриби мають у своєму складі весь спектр ензимів (екзо-, ендоглюканази, целобіогідролази, целобіази, геміцелюлази, пектинметилгідролази, екзо-, ендополігалактуронази), що потрібні для біодеградації складних і водночас широко розповсюджених компонентів. Активність окремих компонентів целюлазного комплексу досить видоспецифічна й істотно залежить від умов культивування [1, 5]. Тому пошук та добір високоактивних культур є першочерговим завданням у вирішенні питання біотрансформації лігноцелюлозної сировини [6]. Базидіальний гриб *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray є космополітом, трапляється на залишках багатьох видів листяних дерев [7]. Про зацікавленість науковців цим грибом та його властивостями свідчать публікації [8–11]. Трофічна невибагливість *S. hirsutum* може вказувати на високий потенціал ензимів гідролітичного комплексу. Враховуючи значну гетерогенність спорового матеріалу, високоактивна дикаріотична культура може становити інтерес для біотехнології.

Мета роботи — дослідити залежність целюлозолітичної активності моно- та дикаріотичних культур сапротрофного гриба *S. hirsutum* за культивування на різних субстратах.

### Матеріали і методи

Попередньому скринінгу було піддано шість дикаріотичних культур *S. hirsutum*. Далі відібрали дві найактивніші культури, які було виділено з плодкових тіл грибів, що зростали у м. Ялті (Південний Берег Криму) — Sh1 та м. Макіївці (Південний Схід України) — Sh7. Виділення чистої культури проводили за загальновідомими методами з використанням перексиду водню [12]. Одержану чисту культуру вирощували на картопляно-агаризованому середовищі у термостаті ТС-80М-2 за температури 26 °С. Моноспорові культури (Sh1-1, Sh1-2, Sh1-3, Sh1-4, Sh7-1, Sh7-2, Sh7-5) отримували методом споривих відбитків, з яких робили змив з наступним багаторазовим розведенням стерильною дистильованою водою. Однорідну водну суспензію базидіоспор висівали глибинно у чашки Петрі на агаризоване середовище й пророщували у термостаті [12]. Чистоту та належність до моноспорових культур контролювали за допомогою мікроскопії.

Штами культивували на рідкому живильному середовищі Чапека такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 2 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 1 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5 г,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,01 г,  $\text{KCl}$  — 0,5 г [13]. Як єдине джерело вуглецю використовували фільтрувальний папір (Whatman № 1, щільність 80 г/м<sup>2</sup>). Природним джерелом вуглецю слугувала дрібна тирса деревини абрикоса (*Prunus* sp.), ясеня (*Fraxinus* sp.) та дуба (*Quercus* sp.) у кількості 50 мг на 20 мл живильного середовища. Культивування проводили у колбах Ерленмеєра об'ємом 100 мл за оптимальної температури 24 °С упродовж 20 діб.

Активність позаклітинних ендоглюканаз визначали на 5-, 10-, 15- та 20-ту добу культивування стосовно Na-карбоксиметилцелюлози (C5678, Sigma). За одиницю активності приймали кількість редуруючих цукрів ( $\mu\text{M}$ ), утворених 1 мг протеїну, що міститься в культуральній рідині, за 1 год. Редууючі цукри виявляли методом Шомоді-Нельсона [12, 14]. Кількість протеїну визначали спектрофотометрично [15, 16].

Якісний склад  $\text{C}_x$ -ендоглюканаз оцінювали електрофоретичним методом. Для цього застосовували 7,5%-й поліакриламідний

гель зі вмістом Na-КМЦ з використанням трис-гліцинової буферної системи (рН 8,3) [17, 18]. Гель витримували протягом 30 хв у 0,2 М фосфатному буфері за температури 50 °С. Потім забарвлювали його, використовуючи барвник конго-червоний. Концентрування культуральної рідини здійснювали за допомогою системи Vivaspin turbo 15 (Sartorius stedim biotech GmbH).

Отримані дані обробляли статистично за допомогою дисперсійного аналізу, зокрема порівняння середніх — за методом Дункана [19].

### Результати та обговорення

Попередній скринінг культур *S. hirsutum* дав змогу встановити найбільш активні ізоляти з подальшим синтезом ензимів целюлозолітичної дії (рис. 1). Так, культура Sh1-4 показала вірогідний максимум активності на 5-ту добу — 319  $\mu\text{M}/\text{mg}$  протеїну. Культура Sh7-2 була менш активною (101  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ), але вірогідний максимум її целюлозолітичної активності також спостерігався на 5-ту добу. Високі показники питомої целюлозолітичної активності на 5-ту добу пояснюються низькою концентрацією загального протеїну в культуральній рідині, що свідчить про високу синтетичну активність у культури саме целюлаз. Однак низька концентрація протеїну унеможлиблює його практичне отримання в цей термін. Слід також зазначити, що хоча дикаріотичні культури Sh1 та Sh7 *S. hirsutum* містять удвічі більше ДНК, вони не мають суттєвої переваги в експресії целюлозолітичних ензимів. Завдяки гетерогенності монокаріотичних культур деякі з них виявляють ендоглюканазну активність, що є значно вищою порівняно з батьківськими культурами.

На другому етапі дослідження використовували культури, найбільш активні за синтезом ензимів целюлозолітичної дії. Встановлено, що загалом питома целюлозолітична активність досліджуваних культур на фільтрувальному папері була вищою, ніж у разі культивування на тирсі дерев різних видів (рис. 2). Вірогідний максимум целюлозолітичної активності у культури Sh1-4 за культивування на тирсі деревини спостерігали на 10-ту добу — 142  $\mu\text{M}/\text{mg}$  протеїну (тирса дуба).

У випадку з культурою Sh7-2 найкращою деревиною був ясень, показник дорівнював 34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  на 20-ту добу культивування (рис. 3). Максимум целюлозолітичної

активності за культивування на деревині абрикоса зафіксовано на 10-ту добу культивування — 21  $\mu\text{M}/\text{мг}$ , а у разі культивування на деревині дуба — 26  $\mu\text{M}/\text{мг}$  на 20-ту добу.

Для електрофоретичного дослідження застосовували культуральні фільтрати ізо-

лятів Sh1-4 та Sh7-2 *S. hirsutum*, що їх було попередньо сконцентровано. Культури вирощували за оптимальних умов на живильному середовищі Чапека, яке містило фільтрувальний папір. Якісний склад целюлаз  $\text{C}_x$ -комплексу наведено на рис. 4.

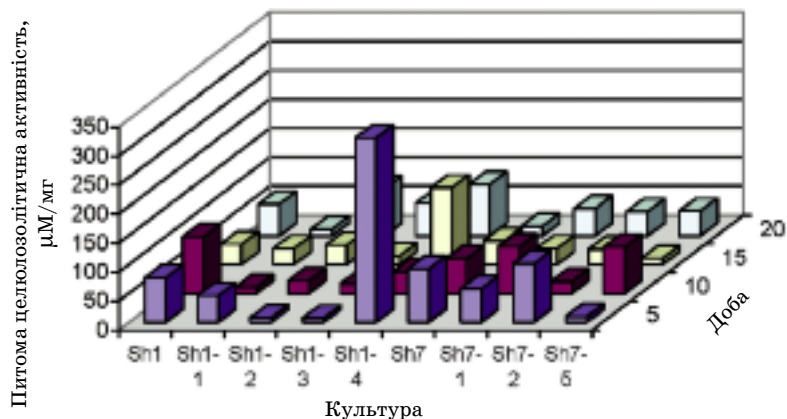


Рис. 1. Порівняльна характеристика питомої целюлозолітичної активності дикаріотичних та моноспорових культур *S. hirsutum*

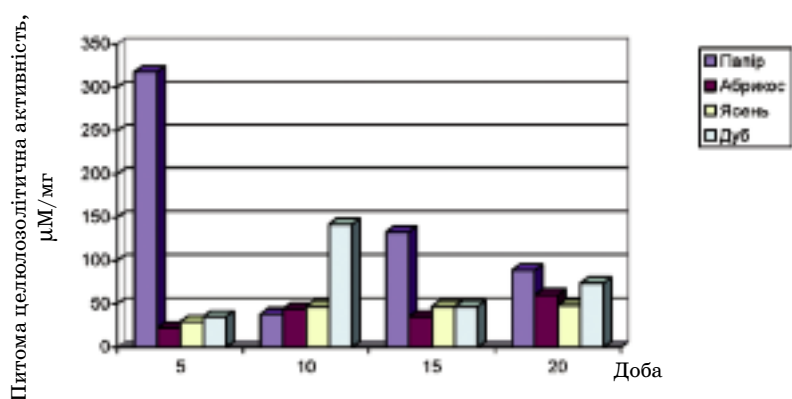


Рис. 2. Порівняння питомої целюлозолітичної активності моноспорової культури Sh1-4 *Stereum hirsutum* за культивування на різних субстратах

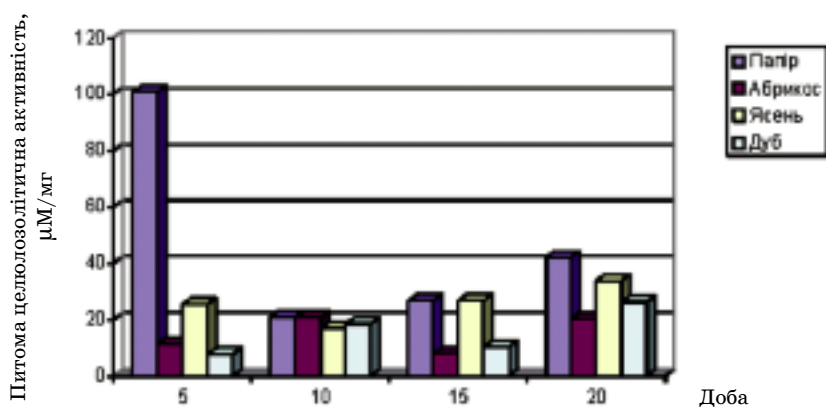


Рис. 3. Порівняння питомої целюлозолітичної активності моноспорової культури Sh7-2 *Stereum hirsutum* за культивування на різних субстратах

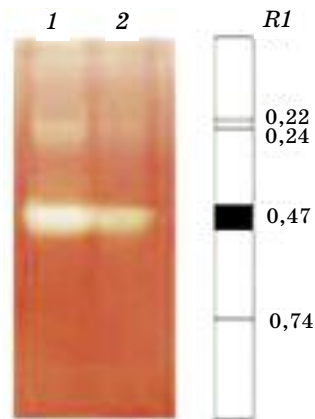


Рис. 4. Електрофореграма  $C_x$ -целюлаз монокаріотичних культур *S. hirsutum*:  
1 — ізолят Sh1-4; 2 — ізолят Sh7-2.

Загалом було виявлено чотири екзоензими  $C_x$ -комплексу культур *S. hirsutum*. Ізоензим з відносною електрофоретичною рухливістю 0,47 добре визначається навіть за умов використання неконцентрованого культурального фільтрату. Концентрування останнього приблизно у 12 разів допомогло визначити ще три ізоензими, однак їхня активність є дуже низькою. За своєю електрофоретичною рухливістю ензими двох культур схожі.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу встановити суттєву гетероген-

ність за целюлозолітичною активністю дита монокаріотичних культур *S. hirsutum*. Визначено монокаріотичні культури Sh1-4 та Sh7-2 як найбільш активні продуценти екзоензимів целюлозолітичної дії. Усі досліджені культури *Stereum hirsutum* мають вищі показники целюлозолітичної активності за культивування на середовищі, що містить фільтрувальний папір. За допомогою зимограми встановлено, що в культур *S. hirsutum* відбувається експресія чотирьох екзоензимів  $C_x$ -комплексу.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. Ферментные системы высших базидиомицетов. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
2. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
3. Wood T. M. Fungal cellulases // Biochem. Soc. Trans. — 1992b. — V. 20. — P. 46–53.
4. Novotny C., Cajthaml T., Svobodova K. et al. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential // Folia Microbiol. — 2009. — V. 54, N 5. — P. 375–390.
5. Билай В. И., Билай Т. И., Мусич Е. Г. Трансформация целлюлозы грибами. — К.: Наук. думка, 1982. — 296 с.
6. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
7. Лессо Т. Грибы: Определитель. — М.: ООО «Издательство АСТ», 2003. — 304 с.
8. Palma C., Contreras E., Urra J., Martinez M. Eco-friendly technologies based on banana peel use for the decolorization of the dyeing process wastewater // Waste Biomass Valor. — 2011. — V. 2. — P. 77–86.
9. Heilmann-Clausen J., Boddy L. Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species // Microb. Ecol. — 2005. — V. 49. — P. 399–406.
10. Nguyen Ngoc-Phuong-Thao, Lee Kyung-Mi, Lee Kyung-Min et al. One-step purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Stereum hirsutum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 87. — P. 2107–2116.
11. Бойко С. М. Різноманітність внутрішньоклітинних ферментних систем природних штамів *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray (*Basidiomycetes*) на території Донецької області // Укр. бот. журн. — 2012. — Т. 69, № 2. — С. 286–291.

12. *Билай В. И.* Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, — 1982. — 50 с.
13. *Семенов С. М.* Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник. — М.: Агропромиздат, 1999. — 240 с.
14. *Green F., Clausen C. A., Highley T. L.* Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing-rugar assay to a microassay using microtiter plates // *Anal. Biochem.* — 1989. — V. 182. — P. 197–199.
15. *Кочетов Г. А.* Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высш. шк., 1980. — 272 с.
16. *Дарбре А.* Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
17. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с.
18. *Bartley T. D., Murphy-Holland K., Eveleigh D. E.* A method for the detection and differentiation of cellulase components in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* — 1984. — V. 14. — P. 157–161.
19. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посібн. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.

**ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ  
ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ  
МОНО- И ДИКАРИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР  
*Stereum hirsutum* (Wild.) Gray  
(*Basidiomycetes*)  
ОТ СУБСТРАТА**

*С. М. Бойко  
М. Е. Рязанова*

Донецкий национальный университет,  
Украина

*E-mail: bsm73@ukr.net*

Исследована активность целлюлозолитических энзимов культур *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray, различных по ядерному статусу, в зависимости от субстрата. Наиболее продуктивными относительно синтеза эндоглюканаз были монокариотические культуры Sh1-4 и Sh7-2. Установлено, что питательная среда, содержащая фильтровальную бумагу, является оптимальной для синтеза целлюлаз (культура Sh1-4, максимум целлюлозолитической активности — 319  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , культура Sh7-2 — 101  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ). Максимум целлюлозолитической активности при культивировании с опилками древесины у культуры Sh1-4 наблюдался на 10-е сут — 142  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (опилки дуба), у культуры Sh7-2 — на 20-е сут — 34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (опилки ясеня). Исследование качественного состава целлюлозолитических энзимов позволило установить наличие четырех экзоэнзимов  $C_x$ -комплекса с относительной электрофоретической подвижностью 0,22; 0,24; 0,47; 0,74. Энзим с относительной электрофоретической подвижностью 0,47 отличается высокой концентрацией и активностью.

**Ключевые слова:** целлюлозолитические энзимы, *Stereum hirsutum*, монокариотические культуры, электрофорез протеинов.

**ACTIVITY DEPENDENCE  
OF CELLULOLYTIC ENZYMES MONO-  
AND DIKARYOTIC CULTURES  
OF *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray  
(*Basidiomycetes*)  
FROM A SUBSTRATUM**

*S. M. Boiko  
M. E. Ryzanova*

Donetsk national university,  
Ukraine

*E-mail: bsm73@ukr.net*

Activity of cellulolytic enzymes cultures *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray, different nuclear status, depending on the substrate have been studied. The most productive by synthesis endoglucanases monokaryotic cultures of Sh1-4 and Sh7-2 were determined. It is found that nutrient medium containing filtering paper is optimal for synthesis of cellulase (culture Sh1-4, maximum of cellulolytic activity is 319  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , culture Sh7-2 — 101  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ). Maximum of cellulolytic activity at cultivation with sawdust of trees for culture Sh1-4 observed at the 10<sup>th</sup> day was 142  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (oak sawdust), for culture Sh7-2 at the 20<sup>th</sup> days it was 34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (ash-tree sawdust). Study of quality cellulolytic enzymes enabled to establish presence of four exoenzymes of  $C_x$  complex with a relative electrophoretic mobility of 0.22; 0.24; 0.47; 0.74. Enzyme with relative electrophoretic mobility 0.47 showed high concentration and activity.

**Key words:** cellulolytic enzymes, *Stereum hirsutum*, monokaryotic cultures, electrophoresis of proteins.