

УДК 582.287.237

© С. М. Бойко, К. Г. Древаль

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЕНДОПОЛІГАЛАКТУРОНАЗНОЇ ТА ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ КУЛЬТУР ДЕРЕВОРУЙНІВНИХ ГРИБІВ *IRPEX LACTEUS* FR. ТА *INONOTUS RADIATUS* (SOWERBY) P. KARST. ЗАЛЕЖНО ВІД ТЕМПЕРАТУРИ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ДЖЕРЕЛА ВУГЛЕЦЕВОГО ЖИВЛЕННЯ**  
*Донецький національний університет; 83050, м. Донецьк, вул. Щорса, 46*

Бойко С. М., Древаль К. Г. Дослідження ендополігалактуроназної та целюлозолітичної активності культур дереворуйнівних грибів *Irpex lacteus* Fr. та *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst. залежно від температури культивування та джерела вуглецевого живлення. – Встановлено, що культури К-1, І-6 *Irpex lacteus* активніше синтезували ферменти ендополігалактуроназної та целюлозолітичної дії, ніж культура СS-1 *Inonotus radiatus*. Живильне середовище, що містило як джерело вуглецю тканину картоплі, найкраще впливало на накопичення в середовищі позаклітинної ендополігалактуронази. Додавання в середовище деревини абрикосу зумовлює різке збільшення активності ферментів целюлозолітичної дії.

*Ключові слова:* ендополігалактуроназа, целюлаза, *Irpex lacteus*, *Inonotus radiatus*, культуральний фільтрат.

### Вступ

Зі всього різноманіття організмів, що існують у біосфері, лише гриби мають необхідні ферментні системи, що дозволяють їм здійснювати повну біохімічну конверсію сполук деревини. Найбільш лабільний і різноманітний ферментативний апарат характерний для дереворуйнівних базидіальних грибів, що зумовлено складною та різноманітною структурою субстратів, які розщеплюються під дією певних екзоферментів та утилізуються завдяки відповідним ендоферментам. Біодеструкція природних субстратів – це поліензимний процес, в якому основну роль відіграють позаклітинні целюлази, протеїнази, пектинази, більша частина яких знаходить практичне застосування людиною [9]. Пектолітичні ферменти використовують при виготовленні вин та соків, при обробці різноманітних рослинних продуктів, наприклад при екстрагуванні крохмалу, вітамінів, лікарських речовин, при заготовці кормів у тваринництві, для оцукрювання вуглецьвмісних відходів, у текстильній промисловості [1, 13]. Не менш важливим є їх використання в біотехнології рослин, разом із комплексом целюлаз вони утворюють ферменти мацеруючої дії, що використовуються під час отримання протопластів клітин [1, 6]. Пошук активних продуцентів целюлаз серед базидіальних дереворуйнівних грибів є актуальним питанням у багатьох країнах [11, 12]. Ферментативне перетворення целюлози, як одного з найпоширеніших природних полімерів, є перспективним не тільки з погляду створення самостійних маловідходних технологій, але й з позиції зниження екологічної небезпеки різноманітних підприємств, що переробляють рослинну сировину та утворюють велику кількість відходів [5, 7]. Вивчення різноманітності ферментного спектру дозволяє не тільки знайти перспективні об'єкти для біотехнології, але й дослідити розподіл активності ензимів залежно від їхнього систематичного положення [2].

*Метою* нашої роботи було дослідити ендополігалактуроназну та целюлозолітичну активність культур дереворуйнівних грибів *Irpex lacteus* Fr. та *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst. залежно від температури культивування та джерела вуглецевого живлення.

### Матеріали та методи дослідження

Об'єктом наших досліджень були культури К-1, І-6 *Irpex lacteus* (Fries, 1828) та СS-1 *Inonotus radiatus* ((Sowerby) Petter Karsten, 1881). Культивування грибів під час дослідження впливу температури на ступінь зміни ендополігалактуроназної активності макроміцетів проводили на рідкому глюкозо-пептоному середовищі, де замість глюкози як джерело вуглецевого живлення використовували пектин (Citric) (г/л): пектин – 1; пептон – 3;  $K_2HPO_4$  – 0,4;  $KH_2PO_4$  – 0,06;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,01;  $CaCl_2$  – 0,05; дистильована вода до 1 л.

Дослідження целюлозолітичної активності проводили на середовищі Чапека (г/л):  $NaNO_3$  – 2;  $K_2HPO_4$  – 1;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $KCl$  – 0,5;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,01; дистильована вода до 1л; фільтрувальний папір марки "Фільтрак" № 5 (m=50 mg на 50 мл середовища).

Культивування проводили за температур 24, 28, 32°C у термостатах ТС-80М-2.

Як єдине джерело вуглецю під час дослідів використовували тирсу деревини абрикосу (*Armeniaca*), сосни (*Pinus*), тополі (*Populus*), тканину картоплі.

Питому ендополігалактуроназну (пектолітичну) активність визначали щодобово протягом 8 діб, а целюлозолітичну активність – на 5, 10, 15 добу культивування.

Визначення ендополігалактуроназної активності здійснювали віскозиметричним методом [5]. За одиницю активності приймали кількість ферменту – ендополігалактуронази (ЕПГ), яка в суворо визначених умовах при температурі 30°C за 10 хв. каталізує гідроліз 1 г пектину зі зниженням в'язкості розчину на 30%.

Про активність ферментів целюлозолітичної дії судили за кількістю утворених редуруючих цукрів у реакційній суміші, що визначали за методом Шомодьї – Нельсона [5], за одиницю часу.

Вимірювання рН середовища після культивування грибів здійснювали потенціометричним методом на рН-метрі "рН-340". Кількість білку визначали на спектрофотометрі "СФ-26" [4].

Отримані дані обробляли методом дисперсійного аналізу. Порівняння середніх арифметичних величин проводили за методами Дункана та Данета [8].

### Результати та обговорення

Отриманні дані з дослідження впливу температури культивування на динаміку пектолітичної активності дослідних культур дозволили встановити наступне (рис. 1-3). Культури К-1 та І-6 *Irpex lacteus* виявили досить високу ендополігалактуроназну активність порівняно з культурою СS-1 *Inonotus radiatus*. Їх максимальні значення вірогідно не відрізнялися між собою. Для культури К-1 оптимальною температурою для біосинтезу ферментів ендополігалактуроназної дії є 28°C. При цій температурі, починаючи з 4 по 8 добу культивування, спостерігалось максимальне значення активності ферменту (0,0246 г/мг), яке вірогідно між собою не відрізнялось. При температурі культивування 32°C накопичення ферменту ендополігалактуроназної дії спостерігається не таке стрімке, але на 7 добу питома ендополігалактуроназна активність вірогідно не відрізняється від максимального значення за температури 28°C. Але надалі спостерігається падіння активності до значення 0,0167 г/мг білку (8 доба).

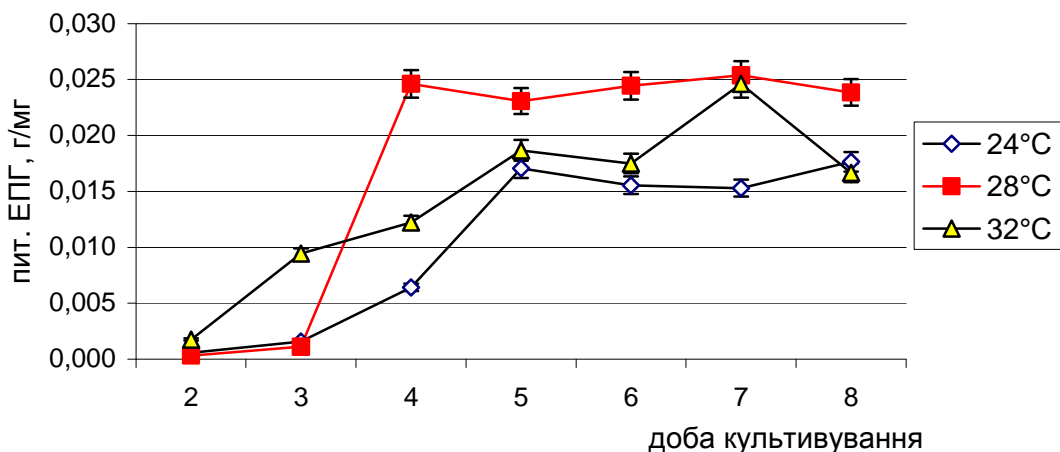


Рис. 1. Динаміка питомої ендополігалактуроназної активності культурального фільтрату ізоляту К-1 *Irpex lacteus* за різних температур культивування.

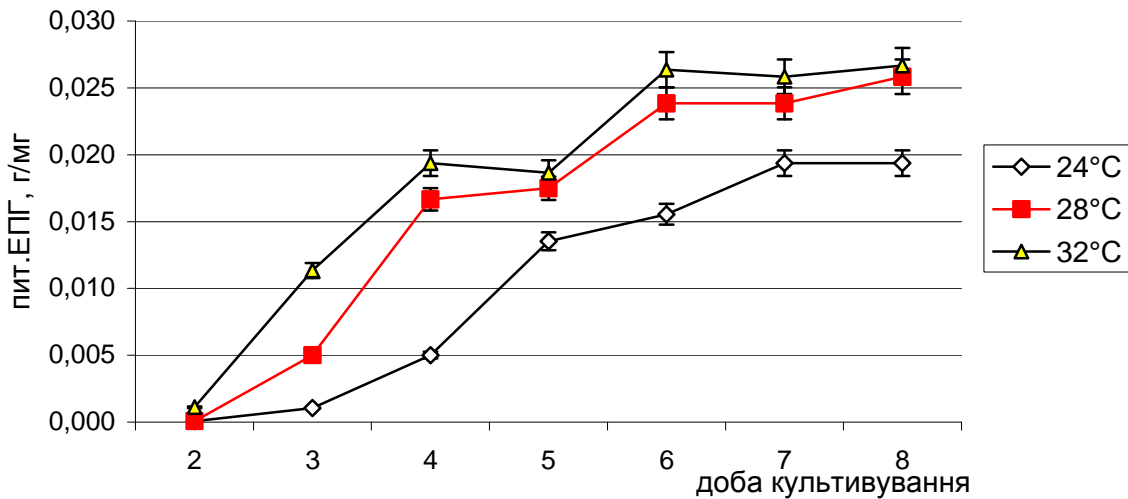


Рис. 2. Динаміка питомої ендополігалактуроназної активності культурального фільтрату ізоляту I-6 *Irpex lacteus* за різних температур культивування.

Культура I-6 *Irpex lacteus* максимальні значення питомої ендополігалактуроназної активності виявила за температури культивування 28°C та 32°C (0,0238 та 0,0264 г/мг відповідно) на 6-8 добу. Дані між собою вірогідно не відрізняються. Температура культивування 24°C, як і в попередньому випадку, була менш сприятлива для накопичення ферменту пектолітичної дії.

Культура CS-1 *I. radiatus* показала низьку здатність до синтезу ферментів ендополігалактуроназної дії (рис. 3). За температури культивування 24°C накопичення відповідного ферменту відбувалось досить повільно, у порівнянні з температурами 28 та 32°C, із досягненням максимальних значень на 8 добу культивування (0,005 г/мг).

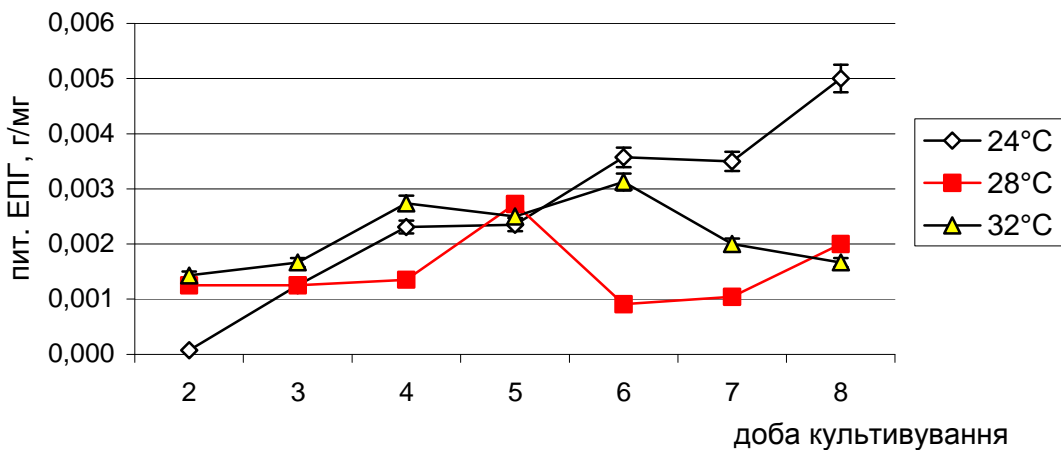


Рис. 3. Динаміка питомої ендополігалактуроназної активності культурального фільтрату ізоляту CS-1 *Inonotus radiatus* за різних температур культивування.

Дослідження впливу температури на синтез культурами K-1, I-6 та CS-1 ферментів целюлозолітичної дії дозволило встановити вірогідний вплив цього фактору. За умов культивування 32°C культури продукували целюлозолітичні ферменти значно активніше, ніж при культивуванні за 24 та 28°C (рис.4). При цьому, на відміну від більш низьких температур культивування, целюлозолітична активність культурального фільтрату ізолятів K-1 та I-6 *I. lacteus* поступово спадала із зростанням терміну проведення досліджу, а ізоляту CS-1 *I. radiatus*, навпаки, поступово зростала (рис. 4 в).

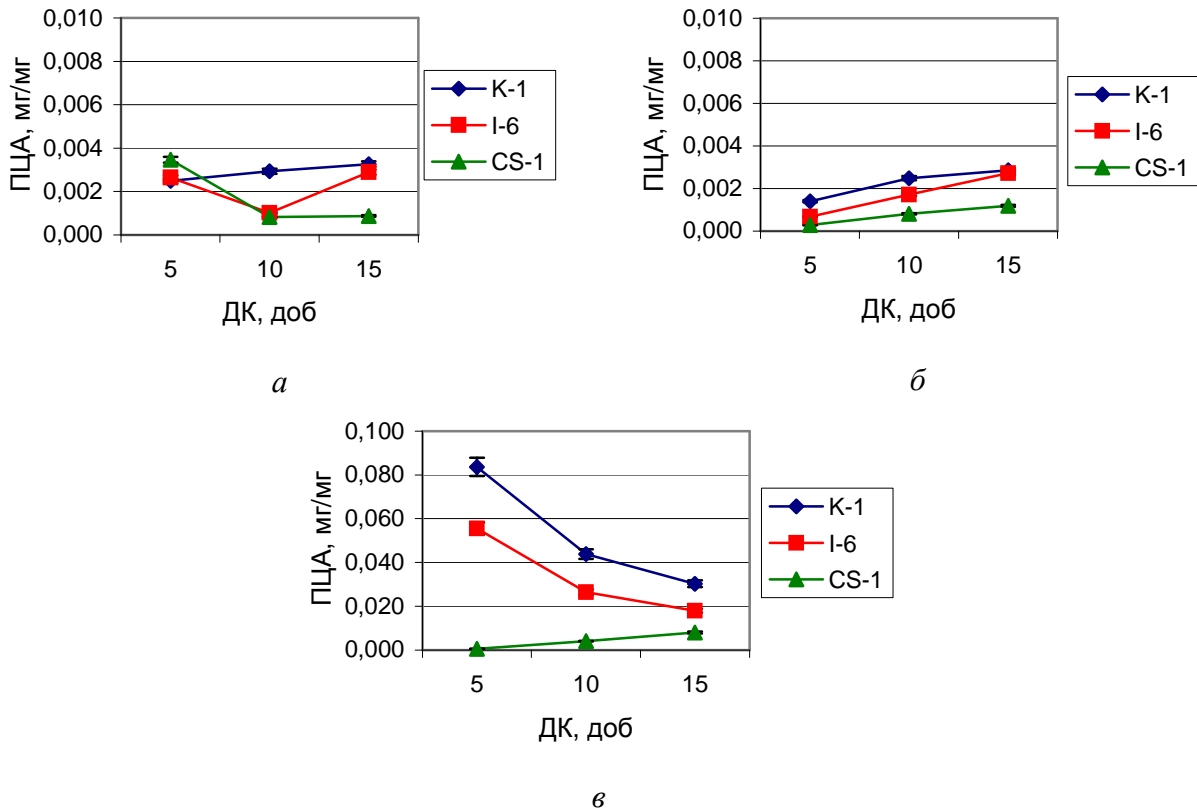


Рис. 4. Динаміка питомої целюлозолітичної активності культур К-1, І-6 *I. lacteus* та CS-1 *I. radiatus* в залежності від температури культивування (а – 24°C, б – 28°C, в – 32°C).

За виключенням 10 доби культивування при 24°C у всіх інших випадках культури К-1 та І-6 *I. lacteus* синтезували целюлази за аналогічною між собою динамікою, що може бути враховано при складанні біохімічної характеристики виду. В цілому культури К-1, І-6 *I. lacteus* в умовах експерименту виділяли у культуральний фільтрат більше целюлозолітичних ферментів, ніж ізолят CS-1 *I. radiatus*. Абсолютне максимальне значення питомої активності целюлаз зафіксовано для культури К-1 *I. lacteus* на 5 добу проведення дослідів при культивуванні за температури 32°C та складало 0,084 мг/мг білку.

Різні джерела вуглецевого живлення істотно впливають на рівень синтезу ферментів пектолітичної та целюлозолітичної дії дереворуйнівних грибів. Проведені дослідження дозволили встановити наступне: культури К-1 та І-6 *I. lacteus* більш активно синтезують позаклітинну ендополігалактуроназу у порівнянні з культурою CS-1 *I. radiatus* на середовищах із вмістом тканини картоплі, тирси деревини сосни та абрикосу (рис. 5-7). Серед досліджуваних культур відрізняється ізолят К-1, який показує найвищу питому ендополігалактуроназну активність. Так, на середовищі з вмістом тканини картоплі – 0,0192 г/мг (9 доба); з вмістом тирси деревини сосни – 0,0156 г/мг (7, 8 доба); з вмістом тирси деревини абрикосу – 0,0047 г/мг білку (10 доба). Звертає на себе увагу той факт, що на середовищі з вмістом тирси деревини абрикосу питома активність є меншою у порівнянні з середовищем, що містить деревину сосни (хоча в природних умовах за трофічними уподобаннями гриб *I. lacteus* обирає саме деревину абрикосу). Можливо, це пов'язано з тим, що під час стерилізації у середовище екстрагуються з деревини речовини, що можуть знижувати синтетичні процеси гриба або інгібувати дію самого ферменту. Якщо порівняти між собою всі три субстрати за впливом на здатність культур синтезувати на них позаклітинні ендополігалактуронази, то найбільш сприятливим є поживне середовище, що утримує в складі тканину картоплі.

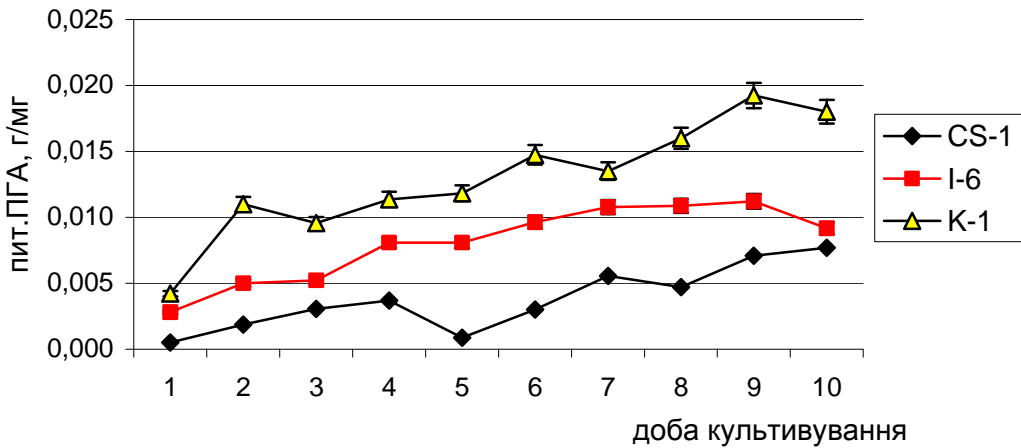


Рис. 5. Динаміка питомої ендополігалактуроназної активності культурального фільтрату ізолятів К-1, I-6 *I. lacteus* та CS-1 *I. radiatus* на середовищі з додаванням тканини картоплі.

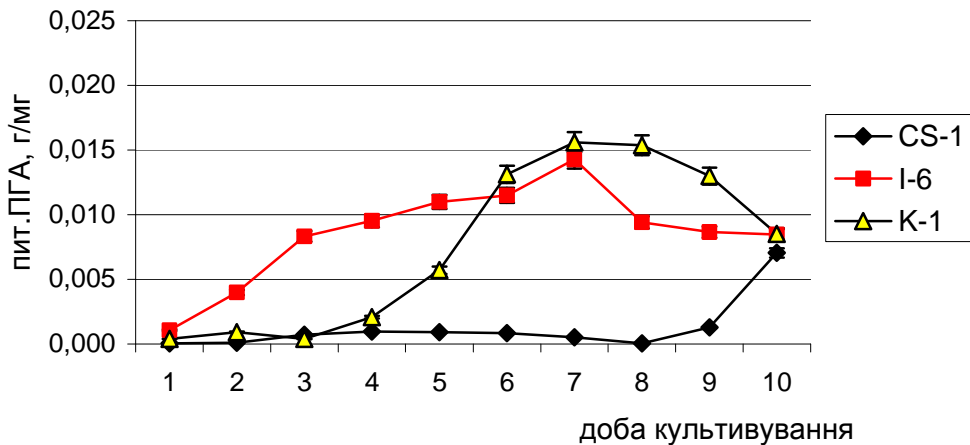


Рис. 6. Динаміка питомої ендополігалактуроназної активності культурального фільтрату ізолятів К-1, I-6 *I. lacteus* та CS-1 *I. radiatus* на середовищі з додаванням тирси деревини сосни.

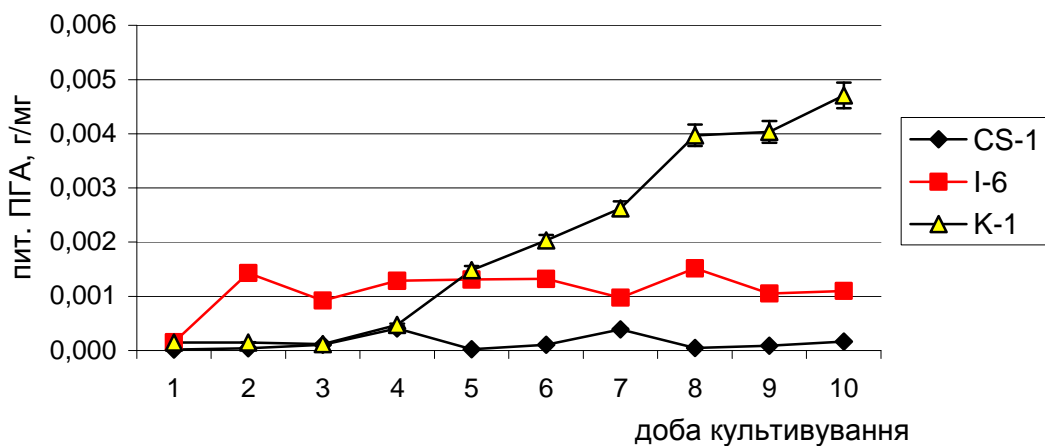


Рис. 7. Динаміка питомої ендополігалактуроназної активності культурального фільтрату ізолятів К-1, I-6 *I. lacteus* та CS-1 *I. radiatus* на середовищі з додаванням тирси деревини абрикосу.

Проведення дослідів із визначення впливу джерела вуглецевого живлення на рівень синтезу дереворуйнівними грибами *I. lacteus* та *I. radiatus* ферментів целюлозолітичної дії виявило вірогідний вплив цього фактора. При культивуванні ізолятів на середовищах із вмістом тирси тополі, сосни, фільтрувального паперу як єдиного джерела вуглецю культуральний фільтрат ізолятів К-1, І-6 *I. lacteus* та СS-1 *I. radiatus* виявляв незначну целюлозолітичну активність (рис. 8).

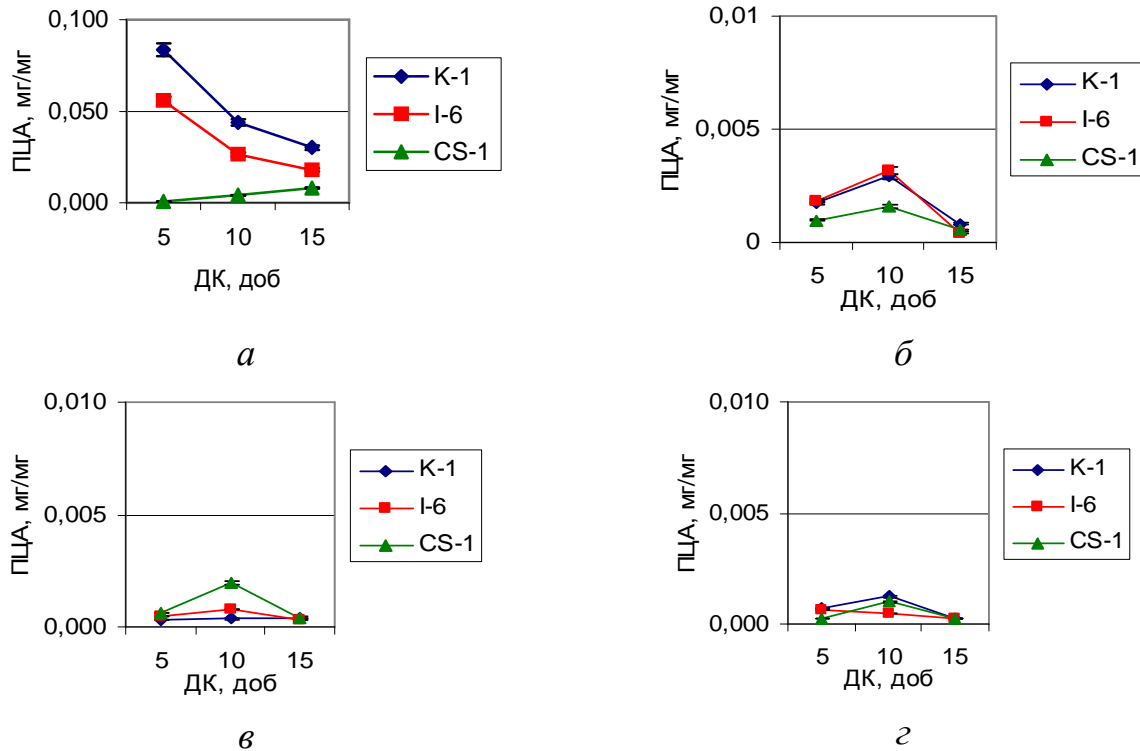


Рис. 8. Динаміка питомої целюлозолітичної активності культур дереворуйнівних грибів *I. lacteus* та *I. radiatus* залежно від джерела вуглецевого живлення (а – *Armeniaca*, б – фільтрувальний папір, в – *Pinus*, г – *Populus*).

Додавання до середовища тирси абрикосу зумовило зростання ПЦА фільтратів досліджуваних ізолятів майже в 10 разів. Абсолютний максимум активності становив 0,84 мг/мг білку та був зафіксований для культури К-1 *I. lacteus* на п'яту добу культивування на середовищі з тирсою абрикосу. У всіх дослідах динаміка ПЦА культур К-1 та І-6, які належать до виду *I. lacteus*, була аналогічною, що може бути використано як додатковий біохімічний показник характеристики цього виду.

### Висновки

1. Культури К-1 та І-6 *Irpex lacteus* виявили досить високу ендополігалактуроназну активність, порівняно з культурою СS-1 *Inonotus radiatus*. Для культури К-1 найбільш оптимальною температурою є 28°C; для культури І-6 – 28°C та 32°C.

2. За умов культивування 32°C культури К-1, І-6 *I. lacteus* та СS-1 *I. radiatus* продукували целюлозолітичні ферменти значно активніше, ніж при культивуванні за температурами 24 та 28°C

3. Найбільш сприятливим для синтезу культурами позаклітинної ендополігалактуронази є живильне середовище, що містить у своєму складі тканину картоплі.

4. Додавання до середовища тирси абрикосу зумовило зростання питомої целюлозолітичної активності фільтратів досліджуваних ізолятів майже в 10 разів. Максимум активності зафіксований для культури К-1 *I. lacteus* на середовищі з вмістом тирси деревини абрикосу.

### Список літератури

1. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН, 1999. – 252 с.
2. Ганбаров Х. Г. Эколого-физиологические особенности дереворазрушающих высших базидиальных грибов / Х. Г. Ганбаров. – Баку: Элм, 1989. – 200 с.
3. Глеба Ю. Ю. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений / Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник. – К.: Наук. думка, 1982. – 104 с.
4. Дарбре А. Практическая химия белка / [А. Дарбре]; Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
5. Методы экспериментальной микологии / [И. А. Дудка, С. П. Вассер, И. А. Илланская и др.]; под ред. В. И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
6. Михайлова Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии / Р. В. Михайлова. – Мн.: Бел. наука, 2007. – 407 с.
7. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы / А. А. Скомаровский, А. В. Марков, А. В. Гусаков [и др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – Т. 42, вып. 6. – С. 674–680.
8. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посібник / Ю. Г. Приседський. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.
9. Ферментные системы высших базидиомицетов / [Н. И. Даниляк, В. Д. Семичаевский, Л. Г. Дудченко, И. А. Трутнева]. – К.: Наук. думка, 1989. – 280 с.
10. Хиггинс И. Биотехнология. Принципы и применение / И. Хиггинс, Д. Бест, Дж. Джонс. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
11. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw / M. Taniguchi, H. Suzuki, D. Watanabe [et al.] // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2005. – V. 100, № 6. – P. 637–643.
12. Purification and Characterization of Exo-b-D-Glucosaminidase from a Cellulolytic Fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7 / N. Masahiro, T. Hiroya, K. Aya [et al.] // Appl. Env. Microbiol. – 1998. – V. 64, № 3. – P. 890–895.
13. Rai Inderpal. Application of biotechnology in the textile industry / Inderpal Rai // Everyman's Science. – 2003. – № 1. – P. 25–30.

**Бойко С. М., Древал К. Г. Исследование эндополигалактуроназной и целлюлозолитической активности культур дереворазрушающих грибов *Irpex lacteus* Fr. и *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst. в зависимости от температуры культивирования и источника углеродного питания.** – Установлено, что культуры К-1, I-6 *Irpex lacteus* активнее синтезировали ферменты эндополигалактуроназного и целлюлозолитического действия, чем культура CS-1 *Inonotus radiatus*. Питательная среда, содержащая в качестве источника углерода ткань картофеля, лучше всего влияла на накопление в среде внеклеточной эндополигалактуроназы. Добавление в среду древесины абрикоса ведет к резкому увеличению активности ферментов целлюлозолитического действия.

**Ключевые слова:** эндополигалактуроназа, целлюлаза, *Irpex lacteus*, *Inonotus radiatus*, культуральный фильтрат.

**Boiko S. M., Dreval K. G. Research of endopolygalacturonase and cellulase activity of cultures wood-destroying fungi *Irpex lacteus* Fr. and *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst. depending on temperature cultivation and a source of carbon nutrition.** – It is established, that cultures K-1, I-6 *Irpex lacteus* synthesized more actively enzymes endopolygalacturonase and celluloselytic action, than culture CS-1 *Inonotus radiatus*. A nutrient medium containing in quality of a source of carbon a fabric of potato, is better influenced on accumulation in the medium of extracellular endopolygalacturonase. Addition in medium of wood apricot conducts to sharp increase on activity of enzymes celluloselytic actions.

**Key words:** endopolygalacturonase, cellulase, *Irpex lacteus*, *Inonotus radiatus*, cultural filtrate.