

**ФІЗІОЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ РОСЛИН, МІКОЛОГІЯ
ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, МИКОЛОГИЯ
PHYSIOLOGY AND ECOLOGY OF THE PLANT, MYCOLOGY**

УДК 582.284 : 577.152.321

© С. М. Бойко, М. В. Малюга

**ЗАВИСИМОСТЬ ПЕКТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ
БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ОТ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ
СРЕДЫ**

Донецкий национальный университет

83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46; e-mail: bsm73@ukr.net; malyuga_marina@mail.ru

Бойко С. М., Малюга М. В. Зависимость пектолитической активности некоторых базидиальных грибов от качественного состава питательной среды. – Изучена зависимость активности экзопектиназ некоторых базидиальных грибов от качественного состава питательной среды. Выявлена перспективная культура Rs-1 *Ramaria stricta* (Pers.) Quél. способная проявлять высокую пектолитическую активность. Из растительных компонентов вносимых в состав питательной среды наиболее благоприятной для синтеза пектиназ является ткань клубня картофеля в концентрации 10 г/л.

Ключевые слова: пектиназы, базидиальные грибы, питательная среда.

Бойко С. М., Малюга М. В. Залежність пектолітичної активності деяких базидіальних грибів від якісного складу живильного середовища. – Вивчена залежність активності екзопектиназ деяких базидіальних грибів від якісного складу живильного середовища. Виявлено перспективну культуру Rs-1 *Ramaria stricta* (Pers.) Quél., яка здатна виявляти високу пектолітичну активність. З рослинних компонентів, що входять до складу живильного середовища найбільш сприятливою для синтезу пектиназ є тканина бульби картоплі у концентрації 10 г/л.

Ключові слова: пектинази, базидіальні гриби, живильне середовище.

Введение

При решении серьезных научных проблем ученые чаще всего обращаются к природе и ее механизмам функционирования. При помощи природных объектов человечество научилось получать кормовые продукты, синтезировать необходимые вещества для медицины и пищевой промышленности, контролировать и влиять на природные процессы [3, 16]. Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объём продукции которых постоянно растёт, а сфера применения неуклонно расширяется [2, 3]. Одним из таких препаратов являются – пектиназы, катализирующие деградацию пектина посредством реакций деполимеризации и деэтерификации. Препараты пектиназ широко применяются в пищевой и текстильной промышленности, медицине, а также в области биотехнологии [5, 7]. Пектиназы составляют около 7,5% мирового рынка промышленных ферментов, оценивающегося десятками миллионов долларов США [10]. Несовершенные грибы, такие как *Aspergillus*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Sclerotium*, *Geotrichum*, *Botrytis* являются основными продуцентами пектиназ, но лидирующее положение при промышленном производстве принадлежит представителям рода *Aspergillus* [9, 12, 15, 17] Растущая потребность в препаратах пектолитического действия обуславливает актуальность поиска активных продуцентов среди объектов живой природы [15]. Изученность высших базидиальных грибов в данном контексте остается недостаточной [1, 4, 8, 13].

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были культуры базидиальных дереворазрушающих грибов: Tv-4 *Trametes versicolor* (L.) Pilat; Cs-1 *Coriolus sinuosus* (Fr.) Bondartsev & Singer; Rs-1 *Ramaria stricta* (Pers.) Quél.; Sh-1-4 *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray.

Для исследования пектолитической активности культуральных фильтратов штаммы инкубировали на пектин-пептонной среде следующего состава (г/л): пектин-3; пептон-3; K_2HPO_4 – 0,4; KH_2PO_4 – 0,6; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001; $CaCl_2$ – 0,05. В дальнейшем в состав среды вносили изменения, а именно: вместо пектина и пептона использовали растительную ткань (клубень картофеля и кожура яблока) из расчета 10 и 40 г/л. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера на 250 мл, содержащих 50 мл питательной среды, при оптимальной температуре – 28°C. Кислотность питательной среды довели до pH 4,0 при помощи 10% раствора HCl. Активность пектиназ определяли в культуральном фильтрате на 6 и 9 сутки культивирования грибов. Активность пектолитических ферментов определяли по методу Кертесза с использованием автоматического титровального аппарата ТПР-М-УХЛ 4.2 (Россия) [11]. За единицу пектолитической активности принимали такое количество фермента, которое при гидролизе пектина образовывало 1 μ M галактуроновой кислоты за 1 мин в условиях опыта (pH = 4, t = 28°C).

Исследования проводили в трехкратной повторности. Результаты исследований обрабатывали статистически, методами дисперсионного анализа, а сравнение средних величин проводили методом Дункана [6].

Результаты и обсуждение

В ходе исследования была изучена динамика общей активности пектолитических ферментов базидиальных культур Tv-4 *T. versicolor*, Cs-1 *C. sinuosus*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum*. Изменение общей пектолитической активности базидиальных культур на стандартной пектин-пептонной среде представлено на рис. 1.

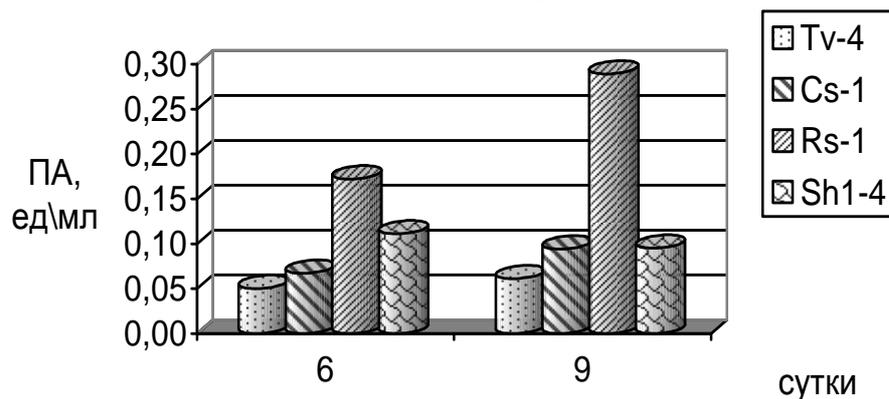


Рис. 1. Динамика общей активности пектолитических ферментов культур Tv-4 *T. versicolor*, Cs-1 *C. sinuosus*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum* на пектин-пептонной питательной среде.

Как видно на рис. 1, культура Rs-1 *R. stricta* показала абсолютный максимум активности ферментов среди всех изученных культур. Следует отметить, что для культур Tv-4 *T. versicolor* и Sh-1-4 *S. hirsutum* с увеличением срока культивирования уровень общей пектолитической активности оставался на одинаковом уровне (в среднем 0,056 и 0,105 ед/мл соответственно), а у культур Cs-1 *C. sinuosus* и Rs-1 *R. stricta* наблюдался рост активности ферментов. Наиболее значимый рост общей активности пектиназ обнаружен на 9 сутки культивирования для культуры Rs-1 *R. stricta* (0,289 ед/мл), что в более чем 3 раза превышает остальные активные культуры.

Динамика общей пектолитической активности базидиальных культур при культивировании на среде с тканью клубня картофеля представлена на рис. 2. Как можно видеть уже на 6 сутки все изученные культуры показали свой максимум активности пектиназ (культура Tv-4 *T. versicolor* – 0,239 ед/мл; Cs-1 *C. sinuosus* – 0,15 ед/мл; Rs-1 *R. stricta* – 0,20 ед/мл; Sh-1-4 *S. hirsutum* – 0,122 ед/мл). Для выращивания культур Tv-4 и Sh-1-4 можно рекомендовать среду с содержанием ткани картофеля с целью получения максимальной активности пектолитических ферментов.

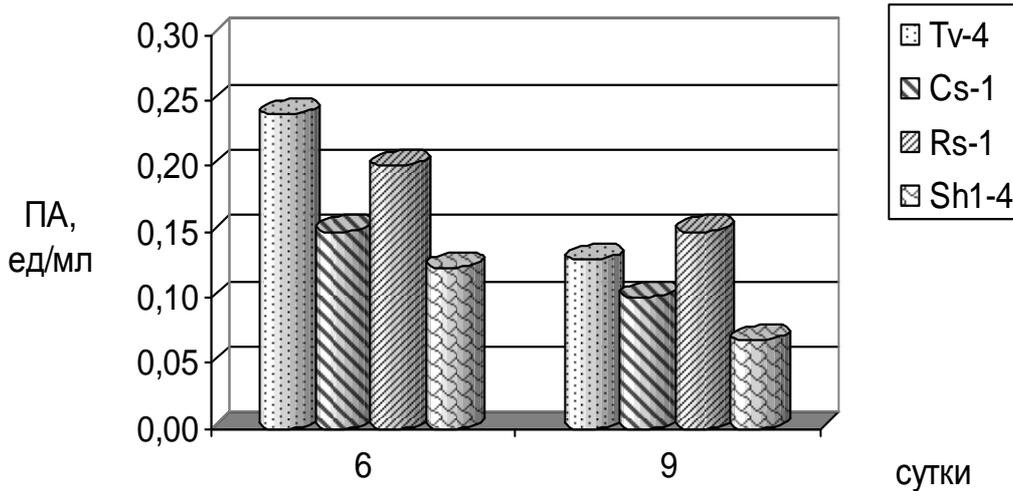


Рис. 2. Динамика общей активности пектолитических ферментов культур Tv-4 *T. versicolor*, Cs-1 *C. sinuosus*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum* на питательной среде, содержащей ткань клубня картофеля (10 г/л)

Так же были проведены исследования по изучению влияния кожуры яблока, как одного из компонентов питательной среды, на уровень активности пектиназ. Влияние кожуры яблок в концентрации 10 г/л представлено на рис. 3. Как можно видеть абсолютный максимум пектолитических ферментов наблюдался для культуры Rs-1 *R. stricta* на 9 сутки культивирования (0,139 ед/мл), однако он оказался ниже, чем на предыдущих питательных средах. Ни для одной из исследуемых базидиальных культур данная среда не может быть рекомендована для их культивирования с целью получения энзимов. Было предположено, что подобная реакция культур грибов наблюдается по причине меньшей концентрации белков и углеводов, содержащихся во вносимых растительных тканях в сравнении с предыдущими. Следующим этапом, было повышение количества вносимой ткани яблока до 40 г/л. Изменение активности пектиназ для исследуемых базидиальных грибов при повышении количества вносимых растительных тканей яблока представлено на рис. 4. Как видно из графика факт повышенного внесения растительных тканей в состав питательной среды в большей мере негативно отразился на общей пектолитической активности грибов. Исключение составила культура Sh-1-4 *S. hirsutum* для нее проявляемая активность пектиназ осталась достоверно неизменной.

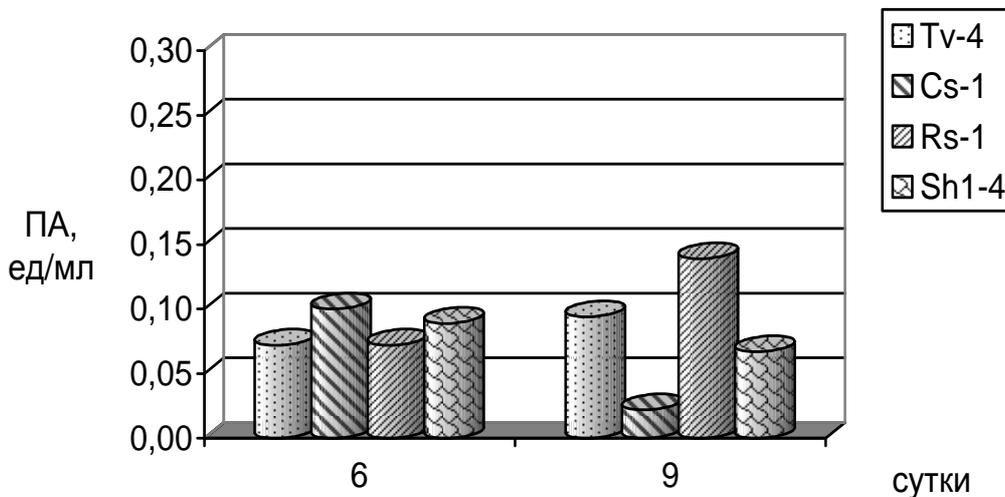


Рис. 3. Динамика общей активности пектолитических ферментов культур Tv-4 *T. versicolor*, Cs-1 *C. sinuosus*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum* на питательной среде, содержащей ткань яблока (10 г/л).

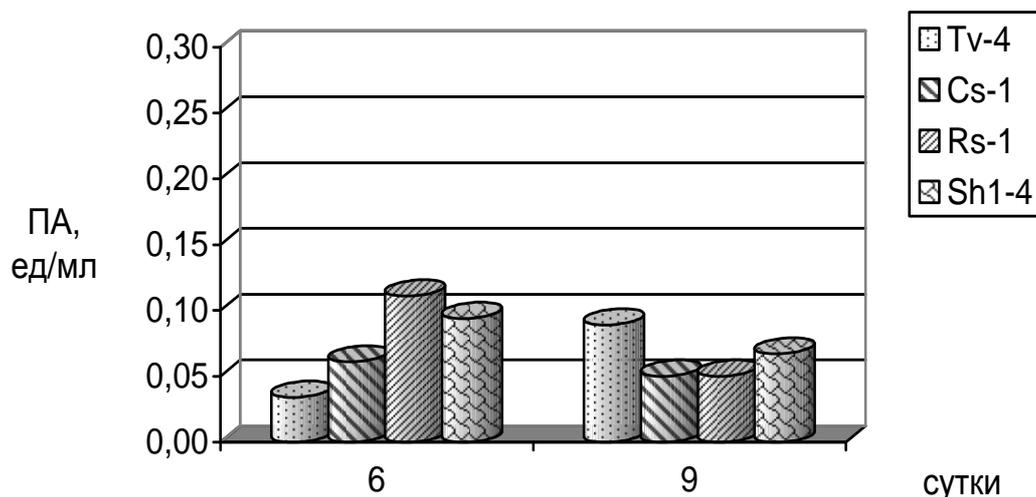


Рис. 4. Динамика общей активности пектолитических ферментов культур Tv-4 *T. versicolor*, Cs-1 *C. sinuosus*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum* на питательной среде, содержащей ткань яблока (40 г/л).

Параллельно исследовался характер изменения кислотности культуральных фильтратов грибов Tv-4 *T. versicolor*, Cs-1 *C. sinuosus*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum* в ходе выращивания (рис. 5). Существенно отличалась по данному показателю от других, среда содержащая ткань яблока в концентрации 40 г/л. Кислотность у всех изучаемых культур оставалась достоверно на одном уровне и не отличалась от контрольного значения (рН 4,0). Возможно, это связано с тем, что при повышенном содержании растительных тканей, в среду, после стерилизации, попадает большое количество веществ кислой природы с буферными свойствами. Не исключено, что такие «новые свойства» питательной среды оказывают негативное влияние на активность ферментов пектолитического действия.

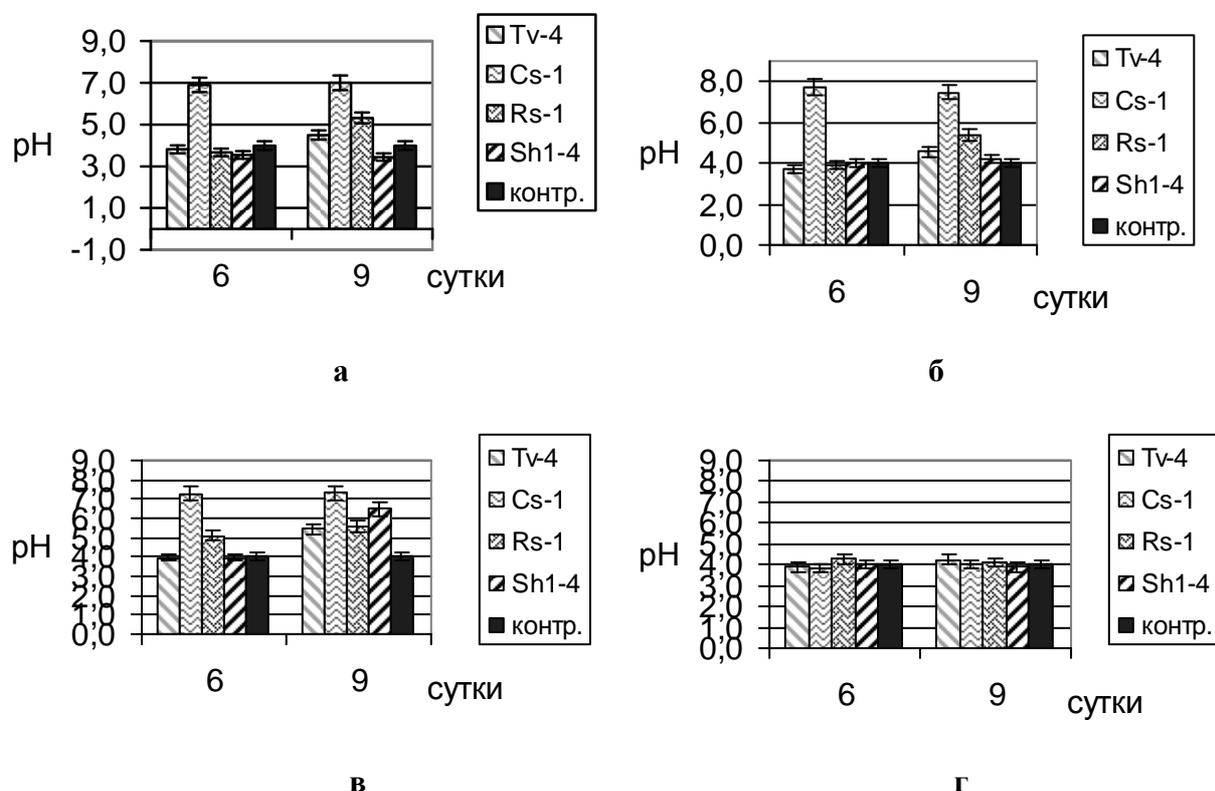


Рис. 5. Характер изменения кислотности культуральных фильтратов Tv-4 *T. versicolor*, Cs-1 *C. sinuosus*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum* на различных питательных средах: а – пектин-пептонная среда; б – среда с тканью клубня картофеля (10 г/л); в – среда с тканью яблока (10 г/л); г – среда с тканью яблока (40 г/л)

Обращает на себя внимание и культура Cs-1 *C. sinuosus*, которая существенно изменяет рН питательной среды до значений рН 7–8. Учитывая данный факт и проявляемую пектолитическую активность, можно говорить о присутствии в культуральном фильтрате пектиназ активных при нейтральных условиях. По аналогии для культур Tv-4 *T. versicolor*, Rs-1 *R. stricta* и Sh-1-4 *S. hirsutum* характерно присутствие пектиназ активных в кислой среде. Наличие грибных пектиназ с разным оптимумом рН действия подтверждают и литературные данные [14, 18].

Выводы

На основании полученных данных, нам удалось выявить перспективную культуру Rs-1 *Ramaria stricta* способную проявлять высокую пектолитическую активность. Из растительных компонентов, вносимых в состав питательной среды, наиболее благоприятной для синтеза пектиназ изученных грибов является ткань клубня картофеля. Резкое изменение рН культуральной жидкости базидиальных культур и проявляемая ими пектолитическая активность позволяет говорить о присутствии пектиназ с различным оптимумом рН действия.

Список литературы

1. Бойко С. М. Дослідження ендополігалактуроназної та целюлозолітичної активності культур дереворуйнівних грибів *Irpex lacteus* Fr. та *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst. в залежності від температури культивування та джерела вуглецевого живлення / С. М. Бойко, К. Г. Древаль // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2009. – № 1 (9). – С. 158–164
2. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 178–197.
3. Даниляк Н. И. Ферментные системы высших базидиомицетов / Н. И. Даниляк, В. Д. Семичаевский, Л. Г. Дудченко и др. – К.: Наук. думка, 1989. – 280 с.
4. Древаль К. Г. Пектолітична активність штамів вищих базидіальних грибів – активних продуцентів целюлозолітичних ферментів / К. Г. Древаль, О. С. Семилетова, С. М. Бойко, М. І. Бойко // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2010. – № 1 (10). – С. 195–199.
5. Калашникова Н. А. Обработка плодово-ягодного сырья композициями ферментных препаратов / Н. А. Калашникова, Р. Н. Гребешова, Г. Б. Купцова и др. // Консервная и овощесушильная промышленность. – 1982. – № 8. – С. 1–3.
6. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: навч. посібник / Ю. Г. Приседський. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.
7. Семенова М. В. Использование препарата грибной пектинлиазы в пищевой промышленности / М. В. Семенова, О. А. Сеницына, В. В. Морозова, Е. А. Федорова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 6. – С. 681–685.
8. Antov M. G. Production of pectinase by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system / M. G. Antov, D. M. Pericin // Enzyme Microb. Technol. – 2001. – 28. – P. 467–472.
9. Bailey M. J. Strain and process for production of polygalacturonase / M. J. Bailey, E. Pessa // Enzyme Microb. Technol. – 1990. – 12. – P. 266–271.
10. Kashyap D. R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review / D. R. Kashyap, P. K. Vohra, S. Chopra, R. Tewari // Biores. Technol. – 2001. – 77. – P. 215–227.
11. Kertesz Z. I. Methods in enzymology / Z. I. Kertesz. – 1955. – Vol. 2. – P. 162–164.
12. Maldonado M. C. Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus niger* / M. C. Maldonado, S. Caceres, E. Galli, A. R. Navarro // Folia Microbiol. – 2002. – 47. – P. 409–412.
13. Pericin D. Rapid method for detection of low basal activity of exo-pectinase of *Polyporus squamosus* / D. Pericin, M. Antov, N. Dimic, B. Vujicic // Biotechnol. Tech. – 1997. – 11. – P. 833–836.

14. Poonam Singh. Evaluation of pectinase activity from the psychrophilic fungal strain *Truncatella angustata*-BPF5 for use in wine industry / Singh Poonam, Burhan Hamid, Mansoor Ahmad Lone et al. // Journal of Endocytobiosis and Cell Research. – 2012. – P. 57–61.

15. Rombouts F. M. Pectic enzymes. Microbial Enzymes and Bioconversion / F. M. Rombouts, W. Pilnik. – London: Academic Press, 1990. – P. 227–282.

16. Smith J. E. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: Current perspectives (Review) / J. E. Smith, R. Sullivan, N Rowan // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – 5. – P. 217–234.

17. Teixeira M. F. S. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586 / M. F. S. Teixeira, J. L. L. Lima Filho, N. Duran // Brazil. J. Microbiol. – 2000. – 31. – P. 286–290.

18. Xavier-Santos S. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting Basidiomycetes and characterization of the enzymes / S. Xavier-Santos, C. C. Carvalho, M. Bonfa et al. // Folia Microbiol. – 2004. – 49 (1). – P. 46–52.

Поступила в редакцію 3.10.2013

Принята в печать 18.11.2013

Boiko S. M., Maluga M. V.

DEPENDENCE OF SOME BASIDIOMYCETES PECTOLYTIC ACTIVITY FROM THE CULTURE MEDIUM QUALITATIVE COMPOSITION

*Donetsk National University; Schorsa Str., 46, Donetsk, 83050, Ukraine
e-mail: bsm73@ukr.net; malyuga_marina@mail.ru*

Growing demand for preparations of pectolytic activities determines the relevance of search for active producers among natural objects. Pectinases preparations are widely used in the food and textile industry, medicine and biotechnology. Pectinases constitute about 7.5% of the world market of industrial enzymes and estimated tens of millions of U.S. dollars.

The paper presents the results of the study of pectolytic activities of Basidiomycetes depending from the qualitative composition of the culture medium.

The most significant increase in the total activity of pectinases found on the ninth day of cultivation culture Rs-1 *R. stricta* (0.289 U/mL), those more than three times more than remaining active cultures. When cultured on a medium with potato tuber tissue maximum values of pectinase activities were achieved by sixth day. On average activity of pectinases amounted to culture Tv-4 *T. versicolor* – 0.239 U/ml; Cs-1 *C. sinuosus* – 0.15 U/ml; Rs-1 *R. stricta* – 0.20 U/ml; Sh-1-4 *S. hirsutum* – 0.122 U/ml.

For the cultivation of strains Tv-4 and Sh-1-4 can be recommended medium containing potato tissue in order to obtain the maximum activity of pectolytic enzymes. Nutrient medium containing the apple tissue at concentrations of 10 and 40 g/l showed an inhibiting effect on the activity of fungi pectolytic enzymes. A significant change in the acidity of cultural liquid of fungi and their enzymatic activity suggests the presence of pectinases with different pH optimum action.

Key words: pectinases, Basidiomycetes, nutrient medium.

References

1. Boiko, S.M., & Dreval, K.G. (2009). 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. Problems of ecology and nature protection of technogenic region, 1(9), 158-164.
2. Grachev, I.M. (1987). Technology of enzymatic preparations, 178-197.
3. Danilyak, N.I. (1989). Enzymatic systems of higher basidiomycetes, 280.
4. Dreval, K.G., Semiletova, A.S., Boiko, S.M., & Boiko, M.I. (2010). Pectolytic activity of higher basidiomycetes – active producers of cellulolytic enzymes. Problems of ecology and nature protection of technogenic region, 1(10), 195-199.
5. Kalashnikov, N.A. (1982). Processing fruit raw material compositions enzyme preparations. Canning and Vegetable Drying CCIA, 8, 1-3.
6. Prisedsky, Yu.G. (1999). Statistical analysis of the results of biological experiments. Donetsk, 210.
7. Semenov, M.V. (2006). Use the fungal pectin preparation in the food industry. Applied Biochemistry and Microbiology, 42(6), 681-685.
8. Antov, M.G., & Pericin, D.M. (2001). Production of pectinase by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. Enzyme Microb. Technol., 28, 467-472.
9. Bailey, M.J., & Pessa, E. (1990). Strain and process for production of polygalacturonase. Enzyme Microb. Technol., 12, 266-271.

10. Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Biores. Technol.*, 77, 215-227.
11. Kertesz, Z.I. (1955). *Methods in enzymology*, 2, 162-164.
12. Maldonado, M.C., Caceres, S., Galli, E., & Navarro, A.R. (2002). Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.*, 47, 409-412.
13. Pericin, D., Antov, M., Dimic, N., & Vujicic, B. (1997). Rapid method for detection of low basal activity of exo-pectinase of *Polyporus squamosus*. *Biotechnol. Tech.*, 11, 833-836.
14. Poonam Singh, Burhan Hamid, Mansoor Ahmad Lone, Kamlesh Ranjan, Asfaq Khan, Vinod K. Chaurse, & Sanjay Sahay (2012). Evaluation of pectinase activity from the psychrophilic fungal strain *Truncatella angustata*-BPF5 for use in wine industry. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 57-61.
15. Rombouts, F.M., & Pilnik, W. (1990). Pectic enzymes. *Microbial Enzymes and Bioconversion*. Academic Press, London, 227-282.
16. Smith, J.E., Sullivan, R., & Rowan, N. (2003). The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: Current perspectives (review). *Int. J. Med. Mushr.*, 5, 217-234.
17. Teixeira, M.F.S., Lima Filho, J.L.L., & Duran, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazil. J. Microbiol.*, 31, 286-290.
18. Xavier-Santos, S., Carvalho, C.C., Bonfa, M., Silva, R., Capelari, M., & Gomes, E. (2004). Screening for pectinolytic activity of wood-rotting Basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia Microbiol.*, 49(1), 46-52.

Received: 3.10.2013

Accepted: 18.11.2013