

УДК 582.287.237:154.33

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА АКТИВНІСТЬ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ГРИБІВ *IRPEX LACTEUS* FR. ТА *CORIOLOUS SINUOSUS* FR.

© 2008 р. С. М. Бойко, К. Г. Древаль

Донецький національний університет
(Донецьк, Україна)

Досліджували здатність представників дереворуйнівних грибів *Irpex lacteus* та *Coriolus sinuosus* до екскреції целюлаз та вплив температури на активність цих ферментів. Встановлено, що культура I-6 *Irpex lacteus* характеризується найвищим рівнем екскреції целюлаз у живильне середовище. Максимальна активність целюлаз спостерігалася під час інкубації субстрату з культуральною рідиною штамів К-1 та I-6 *I. lacteus* за температури 55°C.

Ключові слова: *Irpex lacteus*, *Coriolus sinuosus*, целюлази, термостабільність, екзо- β -1, 4-глюканаза

Целюлозовмісна біомаса реутилізується великою кількістю різноманітних мікроорганізмів з різних екологічних груп [2, 16, 19]. Зі всього різноманіття організмів, що існують у біосфері, лише гриби мають необхідні ферментні системи, що дозволяють їм здійснювати повну біохімічну конверсію сполук деревини. Тому можна без перебільшення сказати, що саме взаємозалежна діяльність рослин та дереворуйнівних грибів лежить в основі біологічного кругообігу лісових екосистем [10, 11].

Дереворуйнівні гриби відіграють особливу роль у розкладанні лігніноцеллюлоз деревини [24]. У багатьох країнах проводиться активний пошук ефективних продуцентів целюлаз, виконуються роботи із удосконалення існуючих штамів мікроорганізмів з метою збільшення секреції різноманітних целюлаз та зниження вартості їх виробництва [14, 15, 21]. Встановлено домінантні види грибів на різних стадіях розпаду целюлозовмісної біомаси, простежено їхню сукцесію при розкладанні окремих порід деревини у різних типах лісу, показана можливість повного розкладання деревини одним певним деструктором. Однак здатність різних видів використовувати лігнін або целюлозу неоднакова [9]. Швидкість освоєння субстрату, ступінь його деструкції, оксидазна активність, ве-

личина біомаси, що утворюється, вміст у ній білка та інші параметри помітно різняться у різних видів та штамів залежно від температурного фактора [3]. Для деяких представників базидіальних грибів було отримано ферментні препарати целюлозолітичної дії та досліджено їх біохімічні показники (*Stereum sanguinolentum* – температурний оптимум 44°C, рН стабільність 2,0-7,5 [17]; *Irpex lacteus* – температурний оптимум 50°C, рН стабільність 3,5-6,0 [20]). Тому вивчення цього питання є актуальним, адже дозволить визначити розподіл такої активності за систематичним положенням грибів та знайти високоактивні культури, придатні для використання у біотехнології.

МЕТОДИКА

Об'єктами досліджень обрано культури вищих дереворуйнівних сапротрофних грибів: К-1, I-6 *Irpex lacteus* Fr. та CS-1 *Coriolus sinuosus* Fr. Вибрані культури належать до порядку *Aphyllphorales*, класу *Basidiomycetes*, відділу *Basidiomycota*. Плодові тіла було зібрано у штучних лісонасадженнях м. Донецька. Визначення видової належності зібраних плодових тіл проводили за визначником трутових грибів [1].

Штами культивували на живильному середовищі Чапека такого складу (г/л): NaNO_3 – 2; K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 [14]. Як джерело вуглецю

Адреса для кореспонденції: Бойко Сергій Михайлович, біологічний факультет, донецький національний університет, вул. Щорса, 46, Донецьк, 83050, Україна

при культивуванні використовували тирсу деревини роду *Armeniaca* [7]. Культивування проводили поверхневим способом у колбах Ерленмейера об'ємом 100 мл з 25 мл живильного середовища за оптимальної температури 32°C у термостаті ТС-80М-2 [6]. Термін культивування складав 5, 10, 15 та 20 діб. Після культивування культуральну рідину фільтрували та використовували для визначення термостабільності ферментів целюлозолітичної дії. Визначення активності целюлозолітичних ферментів у культуральному фільтраті (КФ) грибів проводили за температур 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 та 70°C (термостат ТС-80М-2). Субстратом для визначення активності С₁-ферментного комплексу целюлаз (екзо-β-1,4-глюканаза) був фільтрувальний папір («Фільтрак» №3) [8].

Реакційну суміш, яка містила 1 мл культурального фільтрату та 12 мг субстрату, витримували 24 год у термостаті за певної температури, після чого в ній визначали кількість відновних цукрів. Активність ферментів целюлозолітичної дії визначали за кількістю утворених у реакційній суміші відновних цукрів в результаті гідролізу фільтрувального паперу. Відновні цукри аналізували за методом Шомод'ї – Нельсона [8, 23]. Кількість білка визначали спектрофотометричним методом за допомогою приладу СФ-26 [4], зміну рівня рН культурального фільтрату грибів у процесі їх росту на рН-метрі «рН-150М».

Отримані дані обробляли статистично методом дисперсійного аналізу. Порівняння середніх арифметичних величин проводили за методом Дункана [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Отримані дані показали, що максимальні значення целюлозолітичної активності характерні для представників *I. lacteus* (штами К-1 та І-6) (рис.1). Збільшення целюлозолітичної активності йде поступово з досягненням найвищих значень в період з 10 до 15-ої доби культивування грибів. Максимальне значення загальної целюлозолітичної активності спостерігалось для культури І-6 *I. lacteus* на 15 добу культивування за температури інкубації 55°C і складало 0,83 мг/мл (рис. 1ε). У культури К-1 *I. lacteus* максимальні показники целюлозолітичної активності виявлялись за тих самих умов і становили 0,60 мг/мл. Виявлено, що у культури СS-1 *C. sinuosus* порівняно з ізолятами *I. lacteus* активність екскреції целюлаз була нижчою: максимальні значення активності целюлаз не пере-

вищували значення 0,29 мг/мл (10 доба, температура інкубації 50°C; та 15-20 доба, температура інкубації 60°C). Для цієї культури характерна поступова зміна активності ферментів целюлозолітичної дії (рис. 1 а-і).

Для більшості варіантів досліду культур К-1 та І-6 *I. lacteus* спостерігали падіння активності целюлозолітичних ферментів на 20 добу культивування (крім температур інкубації 25 та 65°C). Для всіх дослідних культур найнижчі показники активності ферментів целюлозолітичної дії зареєстровано за температури інкубації 25 та 70°C. Низьку целюлозолітичну активність за температури реакції 25°C (рис. 1а) можна пояснити насамперед несприятливою температурою для дії ферментів, яка знаходиться нижче оптимальної. Те саме можна сказати і про вплив температури інкубації 70°C, але в цьому разі висока температура викликала денатурацію білка [5].

Дослідження питомої целюлозолітичної активності культуральних фільтратів підтвердили попередні дані щодо абсолютних максимумів целюлозолітичної активності дослідних культур (рис. 2-4). Крім того, можна побачити деякі особливості: у культури К-1 *I. Lacteus* на п'яту добу культивування оптимум дії целюлозолітичних ферментів знаходився у діапазоні 45-55°C (рис. 2).

Зі збільшенням строку культивування, зростає і температурний діапазон дії ферментів: так, на 10 добу з 45 до 65°C (максимум припадає на 45°C); на 15 добу культивування 25-70°C (максимум припадає на 55°C). На 20 добу культивування дієвий діапазон ферментів целюлозолітичної дії зменшується до 45-65°C.

Взявши до уваги, що субстрат (фільтрувальний папір) використовується для визначення С₁-компоненти целюлозолітичного комплексу та факт спостереження кількох піків активності цих ферментів (20 доба, температура інкубації 50 та 65°C), можна припустити існування кількох молекулярних форм білків з целюлозною дією.

Подібні особливості виявлені також для культури І-6 *I. lacteus* (рис. 3).

На 5 добу культивування целюлозолітична активність культурального фільтрату мала максимум за температури реакції 50°C, на 10 добу – 50-60°C, на 15 добу – 55°C, на 20 добу – 65°C. На 15 та 20 добу культивування характер-

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА АКТИВНІСТЬ

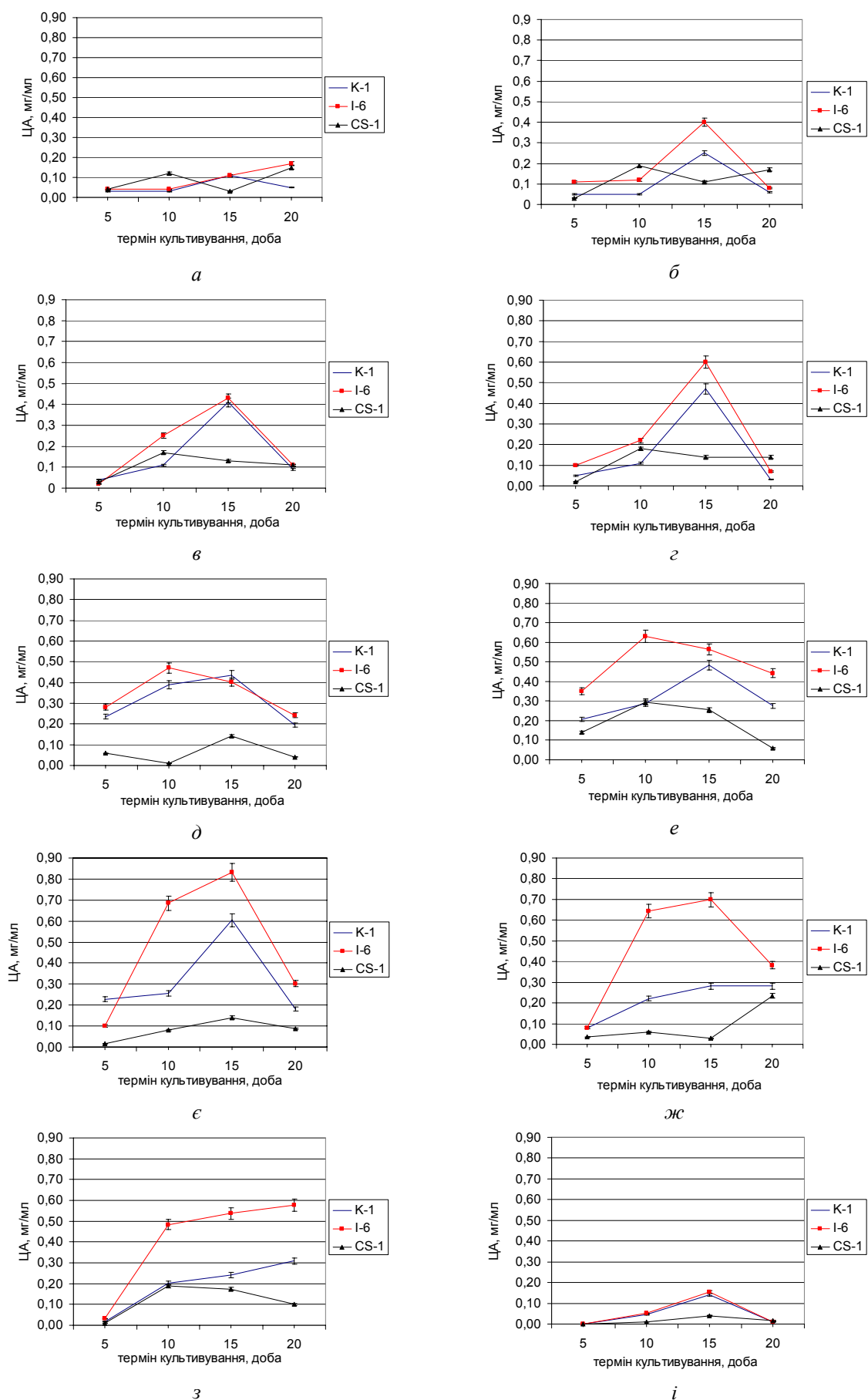


Рис.1. Залежність целюлозолітичної активності культуральних фільтратів штамів K-1, I-6 *I. lacteus* та CS-1 *C. sinuosus* від температури інкубації реакційного середовища (а - 25°C; б - 30°C; в - 35°C; г - 40°C; д - 45°C; е - 50°C; ж - 55°C; з - 60°C; и - 65°C; і - 70°C).

БОЙКО, ДРЕВАЛЬ

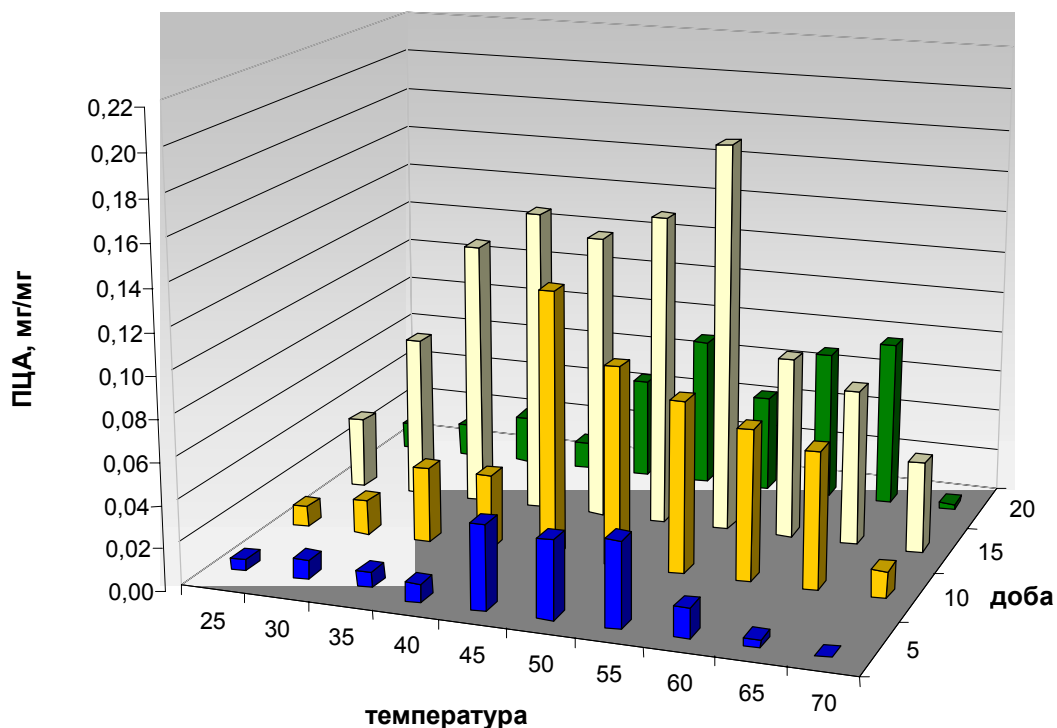


Рис.2. Вплив температури інкубації реакційного середовища на питому целюлозолітичну активність культурального фільтрату штаму K-1 *I. lacteus*.

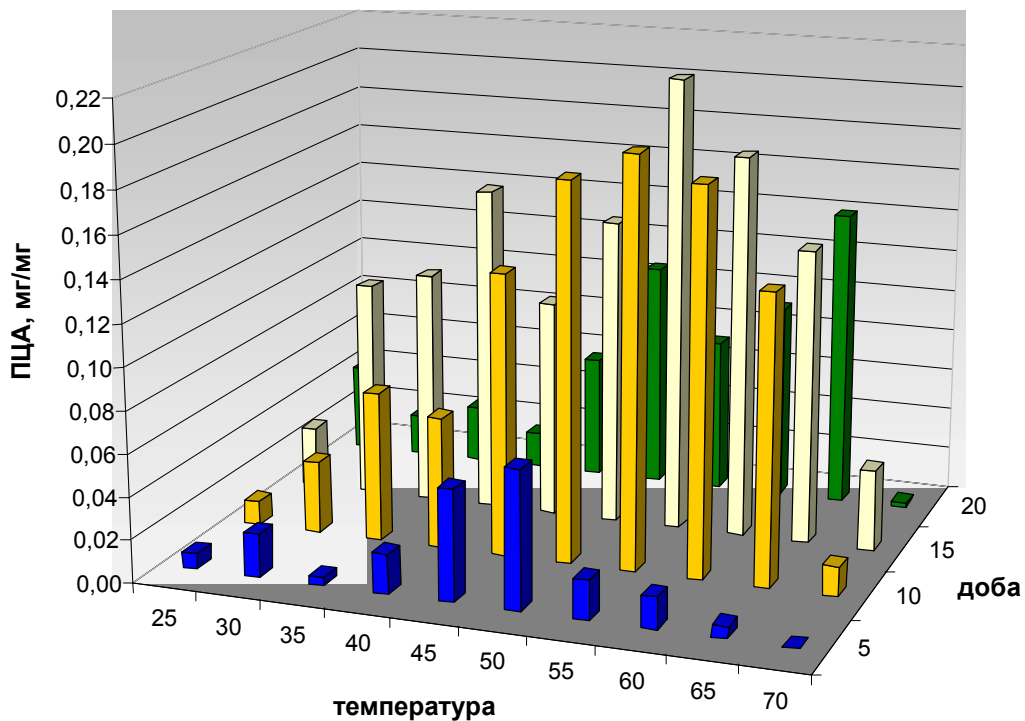


Рис.3. Вплив температури інкубації на питому целюлозолітичну активність культурального фільтрату штаму I-6 *I. lacteus*.

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА АКТИВНІСТЬ

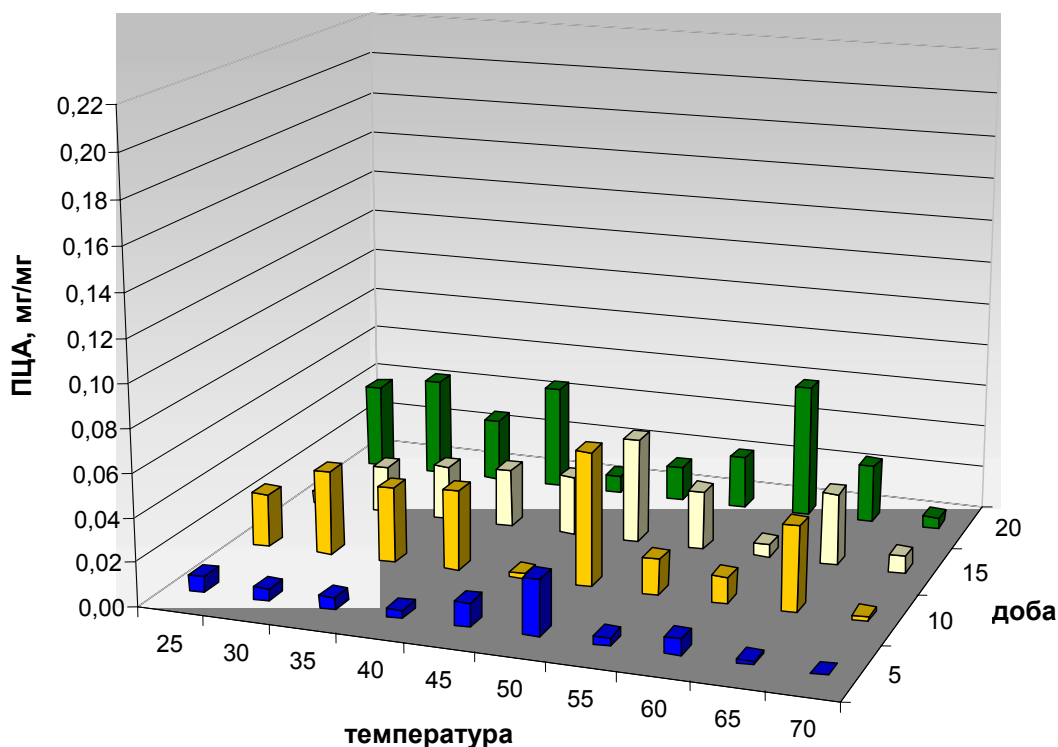


Рис.4. Вплив температури інкубації на питому целюлозолітичну активність культурального фільтрату штаму CS-1 *C. sinuosus*.

на двовершинність зміни питомої целюлозолітичної активності культурального фільтрату культури I-6 *I. lacteus* (15 доба - 40°C та 55°C; 20 доба - 50°C та 65°C), що може свідчити про наявність кількох молекулярних форм целюлозолітичних ферментів (С₁-компонент) у культуральному фільтраті.

Культура CS-1 *C. sinuosus* виявила досить низьку активність ферментів целюлозолітичної дії порівняно з представниками *I. lacteus* (максимум складав 0,062 мг/мг білка проти 0,215 мг/мг білку у культури I-6) (рис. 4). Для цієї культури також простежується наявність кількох молекулярних форм білків целюлозолітичної дії (декілька піків активності ферменту за різних температур на відповідну добу культивування).

При аналізі отриманих даних звертає на себе увагу той факт, що всі дослідні культури зберігали досить високі показники целюлозолітичної активності за високих температур (65°C: культура K-1 – 0,079 мг/мг, культура I-6 – 0,141 мг/мг, культура CS-1 – 0,039 мг/мг). Це свідчить про наявність термостабільних молекулярних форм білків з целюлозолітичною дією у культуральному фільтраті досліджених грибів.

Ця фізіологічна особливість досліджених дереворуйнівних грибів може бути важливою у природних умовах їх існування за високих температур, коли екскретований грибом фермент гідролізує целюлозу та постачає останньому джерело вуглецевого живлення, в той час коли гриб знаходиться у пригніченому фізіологічному стані.

Величина рН субстрату впливає на ріст та метаболізм дереворуйнівних грибів. У процесі росту грибів на відповідному субстраті відбувається регуляція рівня рН живильного середовища [13]. У зв'язку з цим було оцінено значення рН живильного середовища на час проведення дослідження активності целюлозолітичних ферментів культуральних фільтратів культур K-1, I-6 *Irpex lacteus* та CS-1 *Coriolus sinuosus* (таблиця). Встановлено, що значення рН культурального фільтрату протягом культивування знижувалися порівняно з рН вихідного живильного середовища (контроль). Рівень рН незначно коливався в межах 5,0-6,0 одиниць, це дає підстави стверджувати, що для синтезу та дії екзоцелюлозолітичних ферментів грибів K-1, I-6 *I. lacteus* та CS-1 *C. sinuosus* оптимальною є слабкокисло реакція середовища, що збігається з даними літератури [22, 24].

Зміна рН культурального фільтрату штамів К-1, І-6 *I. lacteus* та CS-1 *C. sinuosus* протягом 20 діб культивування

Культура	Доба культивування			
	5	10	15	20
К-1 <i>I. lacteus</i>	5,16±0,15	4,96±0,12	5,48±0,16	4,98±0,10
І-6 <i>I. lacteus</i>	5,56±0,20	5,15±0,14	5,44±0,16	5,13±0,09
CS-1 <i>C. sinuosus</i>	5,51±0,20	5,07±0,28	4,98±0,22	5,43±0,21
Контроль	5,70±0,10			

Таким чином, найбільш активним продуцентом ферментів целюлозолітичної дії є культура І-6 *I. lacteus*, максимальна питома активність целюлаз спостерігалася на 15-ту добу його культивування (0,215 мг/мг білка). Дослідні культури *I. lacteus* та *C. sinuosus* синтезують ферменти целюлозолітичної дії, які гідролізують субстрат за високих температур, що дає підстави віднести їх до групи термостабільних ферментів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бондарцев А.С.* Труговые грибы европейской части СССР и Кавказа. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1953. – 1106 с.
2. *Воробьев Г.И.* Лесная энциклопедия: в двух томах. М.: Советская энциклопедия, 1985. – 563 с.
3. *Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А.* Ферментные системы высших базидиомицетов. – Киев: Наукова думка, 1989. – 280 с.
4. *Дарбре А.* Практическая химия белка: Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
5. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты: в трёх томах. – М.: Мир, 1982. – 1120 с.
6. *Древаль К.Г., Бойко С.М.* Поиск активных продуцентов целюлаз среди сапротрофных дереворазрушающих грибов // Мат-ли читань, присвячених 300-річчю з дня народження К. Ліннея. – Луганськ: Елтон-2, 2007. – С. 36-37.
7. *Древаль К.Г., Бойко С.М.* Вплив породи деревини на целюлозолітичну активність дереворуйнівних грибів // Мат-ли II Міжнар. конф. “Біологія: від молекули до біосфери”. – Харків, 19-21 листопада 2007 року. – Х.: Планета-Принт, 2007. – С. 359-360.
8. *Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др.* Методы экспериментальной микологии. Справочник. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550 с.
9. *Золотарев Ф.Н., Головина Г.И., Сивочуб О.А.* Деградация лигнина базидиомицетами // Мико-

логия и фитопатология. – 1990. – Т. 24, б, вып. 1. – С. 38-44.

10. *Исаева Е.В., Рязанова Т.В., Чупрунова Н.А.* Биоконверсия твердого остатка вегетативной части тополя и топинамбура // Химия растительного сырья. – 2002. – № 2 – С. 149-150.
11. *Мухин В.А.* Грибы и их роль в природе и развитии цивилизации // Изв. Уральск. гос. ун-та. – 1999. – Т. 12, вып. 6. – С. 64-69.
12. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Кассиопея, 1999 – 210 с.
13. *Рипачек В.* Биология дереворазрушающих грибов. – М.: Лесн. пром-сть, 1967. – 276 с.
14. *Семенов С.М.* Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. – М.: Агропромиздат, 1999 – 240 с.
15. *Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В. и др.* Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – Т. 42, вып. 6. – С. 674-680.
16. *Ana M. Lo'pez-Contreras, Gabor K., Martens A.A. et al.* Substrate-Induced Production and Secretion of Cellulases by *Clostridium acetobutylicum* // Appl. Env. Microbiol. – 2004. – V. 70, № 9. – P. 5238-5243.
17. *Bjorndal H., Eriksson K.* Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for breakdown of cellulose. I Characterization of two purified cellulase fraction // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – V. 124, № 1. – P. 149-153.
18. *Halliwell G., Vincent R.* The action on cellulose and its derivatives of a purified 1,4-β-glucanase from *Trichoderma koningii*. // Biochem. J. – 1981. – V. 199. – P. 409-417.
19. *Juy M., Amrt A., Alzari P. et al.* Three-dimensional structure of a thermostable bacterial cellulase // Nature. – 1992. – V. 357. – P. 89-91.
20. *Kanda T., Nakakudo S., Wakabayashi K., Nisizawa K.* The mode of enzymatic degradation

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА АКТИВНІСТЬ

- of cellulose based on the properties of cellulase components // Hydrolysis of cellulose: mechanisms of enzymatic and acid catalysis. – Washington, 1979. – P. 211-236.
21. Masahiro N., Hiroya T., Aya K. et al. Purification and Characterization of Exo-b-D-Glucosaminidase from a Cellulolytic Fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7 // Appl. Env. Microbiol. – 1998. – V. 64, № 3. – P. 890-895.
 22. Masayuki T., Hiroyuki S., Daisuke W. et al. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw // J. Biosci. Bioengin. – 2005. – V. 100, № 6. – P. 637-643.
 23. Nelson N. A. Photometric Adaptation of the Shomogyi Method for the Determination of Glucose // J. Biol. Chem. – 1944. – V. 153, № 2. – P. 375-379.
 24. Ramesh M., Girish B., Mahalingeshwara K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes // Microbiol. Mol. Boil. Rev. – 2000. – V. 64, № 3. – P. 461-488.

Надійшла до редакції
14.07.2008 р.

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON ACTIVITY CELLULOLYTIC ENZYMES OF FUNGUS *IRPEX LACTEUS* FR. AND *CORIOLUS SINUOSUS*

S. M. Bojko, K. G. Dreval

*Donetsk National University
(Donetsk, Ukraine)*

Ability of representatives wood-destroying fungus *Irpex lacteus* and *Coriolus sinuosus* excretion cellulase and influence of temperature on activity of the given enzymes was investigated. It was shown, that the culture I-6 *Irpex lacteus* is characterised by the highest level excretion of the cellulase in cultural liquid. The maximum activity of cellulase at incubation substratum with cultural liquid of strains K-1 and I-6 *I. lacteus* at temperature 55°C was revealed.

Key words: *Irpex lacteus*, *Coriolus sinuosus*, cellulase, thermostability, *exo-β-1,4-glucanase*

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ГРИБОВ *IRPEX LACTEUS* FR. И *CORIOLUS SINUOSUS* FR.

С. М. Бойко, К. Г. Древаль

*Донецкий национальный университет
(Донецк, Украина)*

Изучали способность представителей дереворазрушающих грибов *Irpex lacteus* и *Coriolus sinuosus* экскретировать целлюлазы и влияние температуры на активность данных ферментов. Показано, что культура I-6 *Irpex lacteus* характеризуется самым высоким уровнем экскреции целлюлаз в культуральную среду. Максимальная активность целлюлаз выявлена при инкубации субстрата с культуральной жидкостью штаммов K-1 и I-6 *I. lacteus* при температуре 55°C.

Ключевые слова: *Irpex lacteus*, *Coriolus sinuosus*, целлюлазы, термостабильность, *экзо-β-1,4-глюканаза*