

К.Г. Древаль, К.В. Кузнецова, А.В. Юдіна, М.І. Бойко

Донецький національний університет,  
вул. Щорса, 46, Донецьк, 83050, Україна,  
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

## ДИНАМІКА СИНТЕЗУ ЦЕЛЮЛАЗ ВИЩИМИ ДЕРЕВОРУЙНІВНИМИ БАЗИДІАЛЬНИМИ ГРИБАМИ

*Встановлено, що динаміка синтезу ензимів целюлозолітичного комплексу відрізняється у штамів як одного виду, так і різних видів базидіоміцетів. Для штамів *Irpex lacteus* K-1, А-Дон-02, Д-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 максимальна загальна активність целюлозолітичного комплексу встановлена на 7 добу культивування.*

*Ключові слова: целюлази, ендоглюканази, целобіази, базидіоміцети, динаміка целюлозолітичної активності.*

Целюлозолітичні ензими, що продукуються багатьма мікроорганізмами та грибами [1, 7, 17], останнім часом знаходять застосування у все більш різноманітних галузях науки, сільського господарства та інших видах діяльності людини [18]. Подальша розробка технологій використання целюлаз може привести до розвитку “екологічно дружних” засобів виробництва, зменшивши таким чином антропогенне навантаження на середовище. Однією з найбільш багатообіцяючих технологій використання целюлаз [6, 8] є переробка рослинної сировини (в т.ч. відходів) з отриманням екологічно чистого біопалива, що особливо актуально у сучасних умовах України. Серед низки найважливіших біотехнологічних параметрів будь-якого організма-продуцента є час максимального виходу ензиму [1, 2]. Відповідно до літературних даних, час максимального синтезу целюлозолітичних ензимів для мікроорганізмів не співпадає з максимальним накопиченням біомаси, білку та іншими показниками [11]. Час максимального накопичення целюлаз у культуральних фільтратах для різних організмів коливається в широких межах, тому для кожного окремого продуцента необхідно визначати цей показник. Раніше [4] нами були визначені активні продуценти целюлаз серед вищих базидіоміцетів. Для визначення перспективності їх для біотехнології целюлозолітичних ензимів необхідно встановити терміни активного накопичення ними целюлаз у живильному середовищі.

Метою роботи було дослідження динаміки синтезу целюлозолітичних ензимів вищими дереворуйнівними грибами — активними продуцентами целюлаз.



### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень було визначення динаміки продукції базидіоміцетами в живильне середовище ензимів целюлозолітичного комплексу — ендоглюканази (КФ 3.2.1.4), целобіогідролази (КФ 3.2.1.91) та целобіази (КФ 3.2.1.21). Дослідження проводили зі штамми вищих базидіальних грибів: *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. К-1, А-Дон-02 та Д-1; *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1. Плодові тіла грибів зібрано з деревних рослин, що ростуть на території м. Донецька та Донецької області. Виділення чистих культур проводили відповідно до загальноприйнятих методик [1].

Для дослідження целюлозолітичної активності штамми культивували в стаціонарному стані на рідкому середовищі Чапека такого складу, (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5,  $\text{KCl}$  — 0,5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,01 [1]. В якості єдиного джерела вуглецю використовували фільтрувальний папір Whatman №1 в кількості 8 г/л. Кислотність живильного середовища доводили до рН 7 за допомогою 10% розчину  $\text{HCl}$ , використовуючи аналізатор іонів AI-123 (Україна). Культивування проводили у термостатах ТС-80 та ТС-80-М2 (Росія) протягом 31 доби за температур: 28 °С — штам *S. hirsutum* Sh-1, 32 °С — штам *D. confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 та 34 °С — штамми *Irpex lacteus* К-1, А-Дон-02 та Д-1.

Активність ензимів целюлозолітичного комплексу у культуральних фільтратах (КФ) базидіоміцетів визначали по відношенню до фільтрувального паперу (Whatman №1, щільність 80 г/м<sup>2</sup>) — загальна целюлозолітична активність (ЗЦА), Na-карбоксиметилцелюлози (Sigma, Німеччина), гідроксиетилцелюлози (Sigma, Німеччина) та целобіози (Sigma, Німеччина). Склад реакційних сумішей при визначенні ензиматичної активності та умови проведення реакцій були у строгій відповідності до рекомендацій IUPAC [13] та загальноприйнятих методик [9, 16]. При обчисленні результатів за одиницю активності (IU) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкМ редукуючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкМ глюкози (для целобіози) протягом 1 хв в умовах досліду. Редукуючі цукри визначали методом Шомодї-Нельсона (калібрувальний графік будували за глюкозою) [9]. Глюкозу визначали глюкозооксидазно-пероксидазним методом із застосуванням набору реактивів для визначення глюкози у біологічних рідинах за методикою виробника (Дніпропетровськ, Україна). Вміст білка у КФ визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [3].

Всі дослідження проводили у трикратній повторності. Статистичну обробку проводили методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх арифметичних величин — методом Дункана [10].



## Результати та їх обговорення

На рис. 1 показана динаміка загальної целюлозолітичної активності штамів вищих дереворуйнівних базидіоміцетів з 1 по 31 добу. Для всіх культур спостерігається певна періодичність активності целюлозолітичних ензимів. У всіх штамів, крім *S. hirsutum* Sh-1, ЗЦА поступово зростала з 1 доби. Різке збільшення синтезу целюлаз встановлено з 5 по 7 добу культивування, коли і визначено максимум ЗЦА для цих штамів, що збігається з літературними даними щодо динаміки синтезу целюлаз іншими грибами [11]. Для штаму *S. hirsutum* Sh-1 ЗЦА була незначною до 9 доби експерименту, коли почалося поступове її зростання з максимумом на 14 добу. При подальшому культивуванні штамів відзначалися незначні періодичні піки ЗЦА. Різке зниження загальної целюлозолітичної активності штамів після досягнення максимальних значень можна пояснити інактивациєю ензимів продуктами реакції — редукуючими цукрами, які утворюються при гідролізі фільтрувального паперу у живильному середовищі.

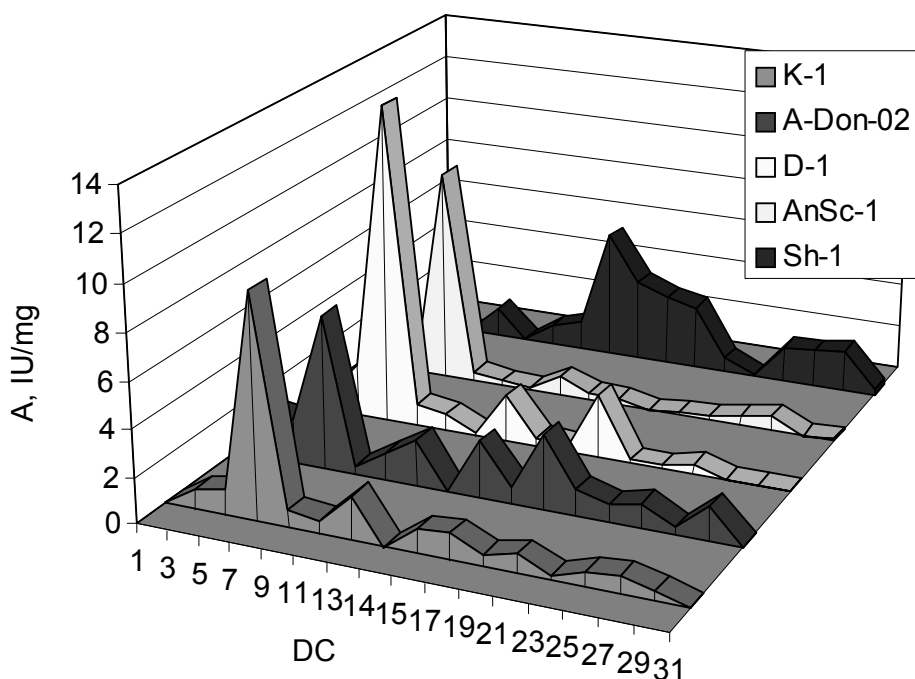


Рис. 1. Динаміка синтезу целюлаз штамами *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність).

Fig. 1. Dynamics of cellulase synthesis by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Динаміку ендоглюканазної активності штамів базидіоміцетів по відношенню до Na-карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) показано на рис. 2. На відміну від ЗЦА, Na-КМЦ активність КФ нарізно змінювалась у досліджуваних штамів. Для штаму *I. lacteus* К-1 максимум встановлено на 17 добу експерименту, штаму *I. lacteus* А-Дон-02 — на 3 добу, штаму *I. lacteus* Д-1 — на 19 добу, штаму *D. confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 — на 5 добу та для штаму *S. hirsutum* Sh-1 — на 7 добу культивування. Після досягнення максимальних значень ендоглюканазна активність по відношенню до Na-КМЦ також зменшувалась, найімовірніше внаслідок інактивзації ензиму продуктами реакції.

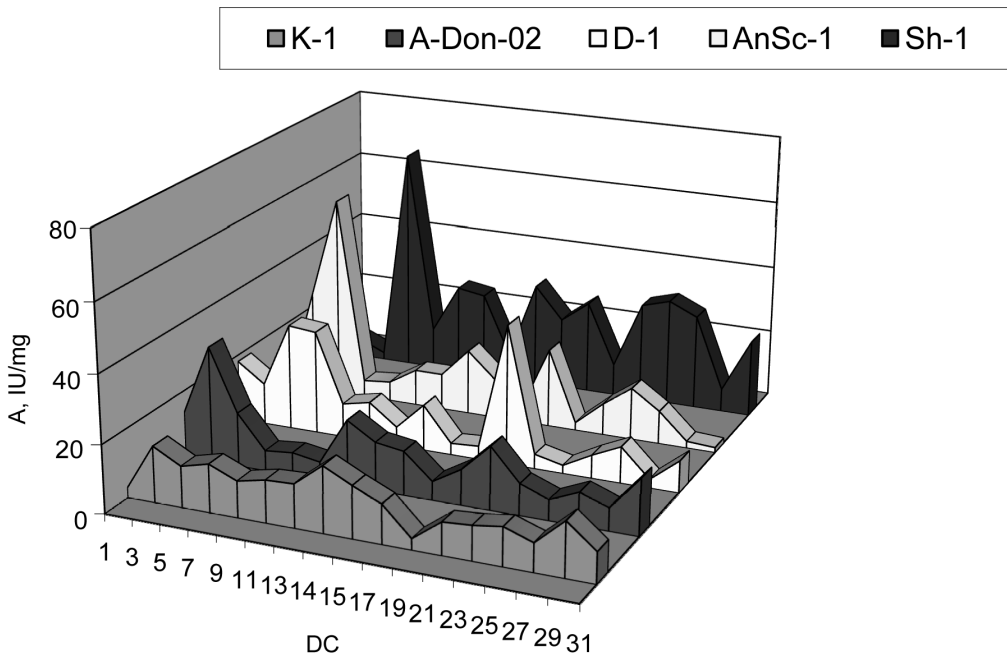


Рис. 2. Динаміка синтезу ендоглюканаз з активністю по відношенню до Na-карбоксиметилцелюлози штамами *Irpex lacteus* К-1, А-Дон-02, Д-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність).

Fig. 2. Dynamics of endoglucanase synthesis with activity towards Na-carboxymethylcellulose by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Як видно з рисунку 3, динаміка ендоглюканазної активності культуральних фільтратів по відношенню до гідроксиетилцелюлози (ГЕЦ) відрізняється від динаміки активності по відношенню до Na-КМЦ, що можна пояснити тим, що ГЕЦ легше гідролізується ензимами [12, 14, 15], вкладом до гідролізу цих сполук не істинно целюлозолітичних ферментів

[9], а також впливом структури замісників у молекулі целюлози [14, 15]. На відміну від целюлозолітичної активності по відношенню до інших субстратів, найвищу ГЕЦ-активність встановлено для штаму *S. hirsutum* Sh-1, що можна пояснити відмінностями у специфічності дії ендоглюканаз різних базидіоміцетів.

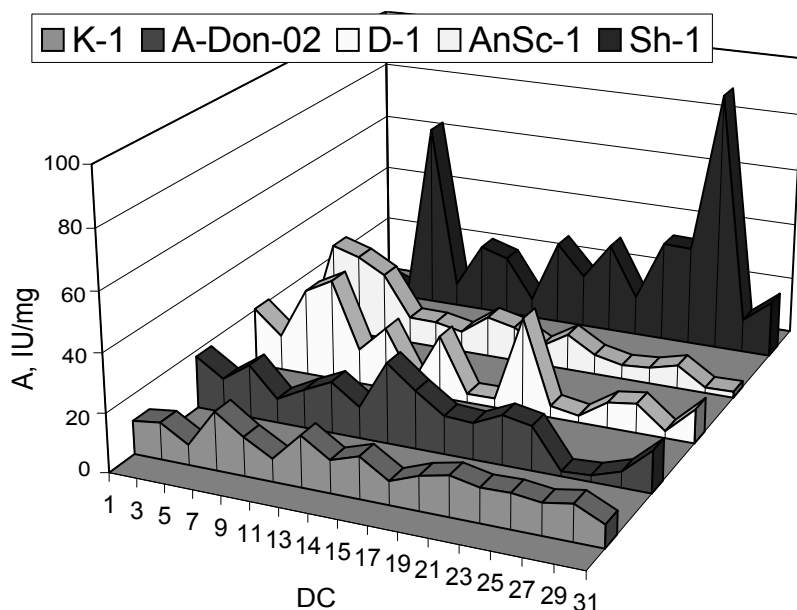


Рис. 3. Динаміка синтезу ендоглюканаз з активністю по відношенню до гідроксиетилцелюлози штамами *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02, Д-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність)

Fig. 3. Dynamics of endoglucanase synthesis with activity towards hydroxyethylcellulose by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Найвищу целобіазну активність встановлено для штаму *I. lacteus* K-1 з максимумом вже на 3 добу експерименту (рис. 4). Пікові значення целобіазної активності штамів *I. lacteus* A-Дон-02, Д-1 та *D. confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 майже співпадають з піковими значеннями ЗЦА, що свідчить про взаємозв'язок цих ферментних систем у розщепленні молекул целюлози. Відсутність такого взаємозв'язку для активностей штамів *I. lacteus* K-1 та *S. hirsutum* Sh-1 найімовірніше обумовлена певною специфічністю їх целобіазних ензимів. Зважаючи на те, що по відношенню до целобіози активність цих штамів вища порівняно із активністю інших штамів, целобіази штамів *I. lacteus* K-1 та *S. hirsutum* Sh-1 скоріше за все відносяться до типу  $\beta$ -глюкозидаз, здатних до гідролізу дисахаридів, у яких обидві частини представлені однаковими залишками [9].

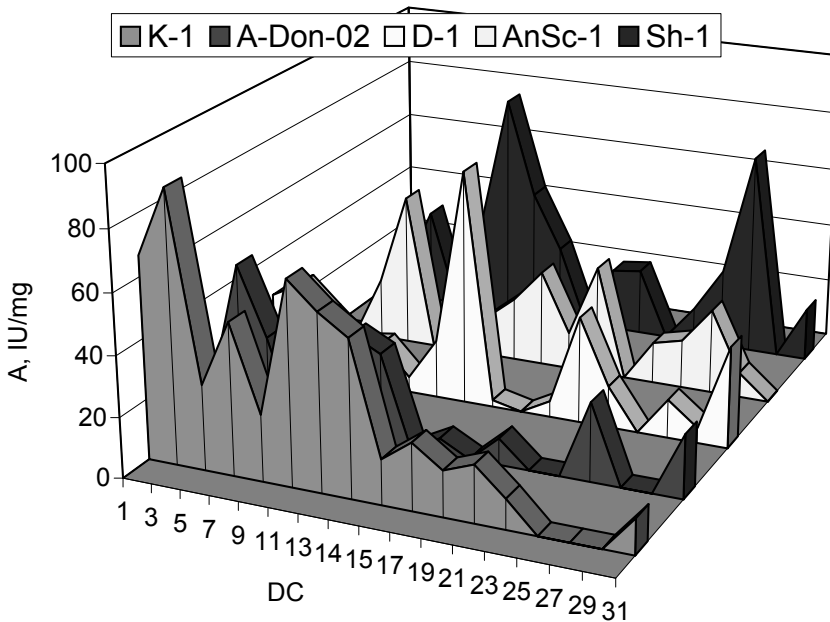


Рис. 4. Динаміка синтезу целобіаз штамами *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02, Д-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність).

Fig. 4. Dynamics of cellobiase synthesis by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що максимальне накопичення ферментів целюлозолітичного комплексу у культуральному фільтраті штамів *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02 та Д-1; *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 відбувається на 7 добу культивування.

Роботу виконано за спонсорської підтримки громадської організації «Развитие» (м. Москва, Росія).

## ЛІТЕРАТУРА

1. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.
2. Волова Т.Г. Биотехнология — Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Рос. Ак. Наук, 1999 — 252 с.
3. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
4. Древаль К.Г., Бойко М.І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.

5. *Жданова Н.М., Олішевська С.В., Василевська А.І. та ін.* Скрінінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат // *Мікробіологія і біотехнологія.* — 2008. — № 3. — С. 58–64.
6. *Кухар В.П.* Біоресурси — потенційна сировина для промислового органічного синтезу // *Біотехнологія.* — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 12–27.
7. *Рабинович М.Л., Мельник М.С.* Прогресс в изучении целлюлозолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы // *Успехи биологической химии.* — 2000. — Т. 40. — С. 205–266.
8. *Сибірний А.* Біопаливний етанол з лігноцелюлози (рослинної біомаси): досягнення, проблеми, перспективи // *Вісник НАН України.* — 2006. — № 3. — С. 32–48.
9. *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.
10. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посібник — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
11. *Ферментные системы высших базидиомицетов* / под ред. Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г. и др. — К.: Наукова думка, 1989. — 280 с.
12. *Child J.J., Eveleigh D.E., Sieben A.S.* Determination of cellulase activity using hydroxyethylcellulose as substrate. // *Canadian Journal of Biochemistry,* — 1973. — Vol. 51, № 1. — P. 39–43.
13. *Ghose T.K.* Measurement of cellulase activity // *Pure & Appl. Chem.* — 1987. — Vol. 59, № 2. — P. 257–268.
14. *Goyal A., Ghosh B., Eveleigh D.* Characteristic of fungal cellulases. // *Bioresource technology.* — 1991. — Vol. 36, № 1. — P. 37–50.
15. *Keilich G., Bailey P.J., Afting E.G. et al.* Cellulase ( $\beta$ -1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. Part II. Characterization. // *Biochimica et Biophysica Acta — Enzymology.* — 1969. — Vol. 185, № 2. — P. 392–401.
16. *Mullings R.* Measurement of saccharification by cellulases // *Enzyme Microb. Technol.* — 1985. — Vol. 7, № 12. — P. 586–591.
17. *Wood T.M., Garcia-Campayo V.* Enzymology of cellulose degradation. // *Biodegradation.* — 1990. — 1. — P. 147–161.
18. *Xing-hua L., Hua-jun Y., Bhaskar R. et al.* The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization // *African Journal of Biotechnology.* — 2009. — Vol. 8 (11). — P. 2418–2422.



К.Г. Древаль, Е.В. Кузнецова, А.В. Юдина, М.И. Бойко

Донецкий национальный университет,  
ул. Шорса, 46, Донецк, 83050, Украина,  
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

## ДИНАМИКА СИНТЕЗА ЦЕЛЛЮЛАЗ ВЫСШИМИ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИМИ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

### Реферат

Установлено, что динамика синтеза энзимов целлюлозолитического комплекса отличается у штаммов как одного вида, так и разных видов базидиомицетов. Для штаммов *Irpex lacteus* К-1, А-Дон-02, Д-1 и *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 максимальная общая активность целлюлозолитического комплекса установлена на 7 сутки культивирования.

**Ключевые слова:** целлюлазы, эндоглюканызы, целлобиазы, базидиомицеты, динамика целлюлозолитической активности.

K.G. Dreval, K.V. Kuznetsova, A.V. Yudina, M.I. Boyko

Donetsk National University, 46, Schorsa str., Donetsk, 83050, Ukraine,  
tel.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

## DYNAMICS OF CELLULASE SYNTHESIS BY HIGHER WOOD-DEGRADING BASIDIOMYCETES

### Summary

The difference between the dynamics of cellulase synthesis of different strains were established, even if the strains belong to the same species. The maximal specific filter paper activity for strains *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02 and Д-1; *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 was established on the 7<sup>th</sup> day of cultivation.

**Key words:** cellulases, endoglucanases, cellobiases, basidiomycetes, dynamic of cellulolytic activity.

Одержано 09.11.2011.

