

УДК 577.152.321+663.11

КУЛЬТИВУВАННЯ БАЗИДІОМІЦЕТІВ — АКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ. ІІІ. ЕНДОГЛЮКАНАЗНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ФІЛЬТРАТІВ СТОСОВНО ГІДРОКСІЕТИЛЦЕЛЮЛОЗИ

К. Г. Древалъ
М. І. Бойко

Донецький національний університет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Отримано 06.10.2011

Проведено підбір умов культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів за факторами рН живильного середовища (значення змінювалися від 3 до 9 рН з інтервалом 1 од) і температури (значення варіювали від 24 °С до 36 °С з інтервалом 2 °С). Визначали активність ендоглюканази (КФ 3.2.1.4) щодо гідроксіетилцелюлози. Встановлено, що оптимальною початковою кислотністю живильного середовища для штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpeх lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* є рН 7, а для штаму Sh-1 *Stereum hirsutum* — рН 5; оптимальна температура культивування для штамів Д-1 *Irpeх lacteus* та Sh-1 *Stereum hirsutum* — 30 °С, для А-Дон-02 *Irpeх lacteus* — 32 °С, для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — 34 °С, а для штаму К-1 *Irpeх lacteus* — 36 °С. У результаті оптимізації умов культивування значення ендоглюканазної активності зросли в 1,43 раза для штаму К-1 *I. lacteus*, в 1,79 — для А-Дон-02 *I. lacteus*, у 2,15 — для Д-1 *I. lacteus*, у 2,95 — для AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* та у 8,08 раза для штаму Sh-1 *S. hirsutum*. Водночас, у результаті підбору умов культивування питома ендоглюканазна активність щодо гідроксіетилцелюлози штаму К-1 *I. lacteus* зросла в 1,42 раза, А-Дон-02 *I. lacteus* — 2,52 раза, Д-1 *I. lacteus* — 2,63 раза, штаму Sh-1 *S. hirsutum* — 5,22 раза та штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* — у 16,67 раза. Штам J-2An *Phellinus pomaceus* не виявив ендоглюканазної активності у жодному варіанті досліджу. Максимальну ендоглюканазну активність щодо гідроксіетилцелюлози для всіх штамів встановлено на 7-му добу культивування.

Ключові слова: базидіоміцети, ендоглюканаза, гідроксіетилцелюлоза, температура культивування, кислотність середовища, оптимізація, *Irpeх lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.

Сучасна біотехнологія відчуває гостру нестачу активних продуцентів ензимів целюлозолітичної дії з метою їх використання у процесах промислової утилізації целюлозовмісних відходів та отримання біопалива [1]. Саме тому останнім часом у світі проводять активні дослідження з пошуку нових продуцентів целюлаз серед бактерій, грибів відділів *Zygomycota* та *Ascomycota* [2–4]. Проблема використання базидіоміцетів як джерела целюлаз полягає у недостатній вивченості цієї групи організмів як об'єктів біотехнології. Хоча аналіз та порівняння існуючих даних літератури дають підстави припустити, що базидіоміцети синтезують целюлази повільніше за нижчі гриби та/або бактерії, однак ензими базидіальних грибів активніші порівняно із традиційними продуцентами целюлозолітичних ензимів [5–9].

Поряд із пошуком активних продуцентів ензимів целюлозолітичної дії актуальним є питання дослідження їхніх фізіолого-біохімічних особливостей, зокрема визначення оптимальних значень рН середовища та температури культивування, оскільки целюлази з високими значеннями оптимумів рН і температури нещодавно було визнано одним із найважливіших факторів для успішного перебігу деструкції відновлювальної сировини в промисловості [10, 11]. Актуальність визначення оптимального режиму культивування базидіоміцетів визначається також і тим, що попередньо знайдені [5] штами базидіальних грибів уперше досліджують як активні продуценти целюлозолітичних ензимів.

Першим ензимом, який атакує нативну целюлозу, є ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4) [12,13], тому здатність перспективних штамів проду-

центів целюлаз до надсинтезу цього ензиму є вкрай важливою. Ендоглюканази з різних джерел відрізняються за своїм складом та властивостями, зокрема за специфічністю дії [11, 14–16]. Оскільки на ендоглюканазну активність істотно впливає структура замісника в молекулі целюлози [17], а також його заряд [18] та беручи до уваги те, що до гідролізу розчинних похідних целюлози можуть робити внесок не істинно целюлозолітичні ензими [13, 14], для повноцінного оцінювання активності ендоглюканази потрібно проводити дослідження щодо кількох субстратів. Паралельно із загальноприйнятим субстратом для визначення ендоглюканазної активності — Na-карбоксиметилцелюлози — відповідно до даних літератури та рекомендацій IUPAC [19–21] слід здійснювати дослідження також і щодо гідроксіетилцелюлози (ГЕЦ), яка легше піддається гідролізу через природу замісника.

Метою роботи було визначення оптимальних значень температури та рН живильного середовища для культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів для підвищення синтезу позаклітинної ендоглюканази, здатної до гідролізу гідроксіетилцелюлози.

Матеріали і методи

Визначали вплив початкової кислотності живильного середовища та температури культивування на здатність базидіоміцетів до синтезу ендоглюканази у складі целюлозолітичного комплексу. Об'єктами досліджень були 6 штамів вищих базидіальних грибів, що їх на попередньому етапі скринінгу [5] відібрали як активні продуценти целюлаз: K-1, A-Дон-02 та D-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.; Sh-1 *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.; AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schrot. та J-2An *Phellinus pomaceus* (Pers.) Maire.

Для дослідження ендоглюканазної активності (ЕА) штами культивували на рідкому середовищі Чапека такого складу (г/л): NaNO_3 — 2, K_2HPO_4 — 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KCl — 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 [22]. Як єдине джерело вуглецю до середовища додавали фільтрувальний папір Whatman №1 у кількості 8 г/л. Початкове рН живильного середовища доводили до значень від 3 до 9 з кроком 1 рН за допомогою 10%-х розчинів HCl або NaOH на аналізаторі іонів AI-123 (Україна). Штами культивували упродовж 14 діб за температури від 24 до 36 °C з інтервалом 2 °C в термостатах ТС-80 та ТС-80-M2 (Росія).

ЕА ензимів у складі целюлозолітичного комплексу культуральних фільтратів (КФ)

базидіоміцетів визначали щодо 1%-го розчину ГЕЦ (Sigma, Німеччина). Склад реакційних сумішей при визначенні ензиматичної активності та умови проведення реакцій відповідали рекомендаціям IUPAC [20] і загальноприйнятим методикам [13, 14]. Обчислюючи результати, за одиницю активності (од) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкМ редукуючих цукрів протягом 1 хв за стандартних умов (рН = 4,8; t = 40 °C). Питому активність (од/мг протеїну) знаходили за відношенням загальної активності культурального фільтрату (од/мл) до вмісту протеїнів у ньому (мг протеїну/мл). Редукуючі цукри визначали методом Шомоді-Нельсона (калібрувальний графік будували за глюкозою) [13, 23], вміст протеїну в КФ — спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [24].

Усі дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали методами дисперсійного аналізу, порівняння середніх — методом Дункана [25].

Результати та обговорення

Результати дослідження загальної ЕА КФ базидіоміцетів щодо ГЕЦ на 7-му та 14-ту добу культивування подано на рис. 1 і 2 відповідно.

З рис. 1, а видно, що на 7-му добу проведення досліду КФ штаму K-1 *I. lacteus* виявляв високу активність у діапазоні температур 30–34 °C за культивування на живильному середовищі з рН 4–7. Високе значення ЕА стосовно ГЕЦ у цього штаму встановлено за температури 34 °C на середовищі з рН 5, коли й зафіксовано максимум активності на 7-му добу культивування. Однак воно достовірно не відрізнялось від значення активності цього штаму щодо ГЕЦ, встановленого на 14-ту добу культивування (рис. 2, а). Таким чином, у результаті оптимізації умов культивування штаму K-1 *I. lacteus* значення ЕА КФ стосовно ГЕЦ збільшено в 1,43 раза.

Для штаму A-Дон-02 *I. lacteus* на 7-му добу культивування встановлено 2 зони високої ЕА КФ щодо ГЕЦ, які спостерігали на середовищах з рН 3–8 за температур 24 °C та 28–36 °C (рис. 1, б). На 14-ту добу культивування інтервал оптимальних значень рН живильного середовища звужувався до рН 4 для першої та рН 7 для другої зони (рис. 2, б). Абсолютне максимальне значення активності ензиму КФ цього штаму встановлено на 7-му добу експерименту зі зростанням на середовищі з рН 7 та за температури 32 °C. При цьому одержане значення активності

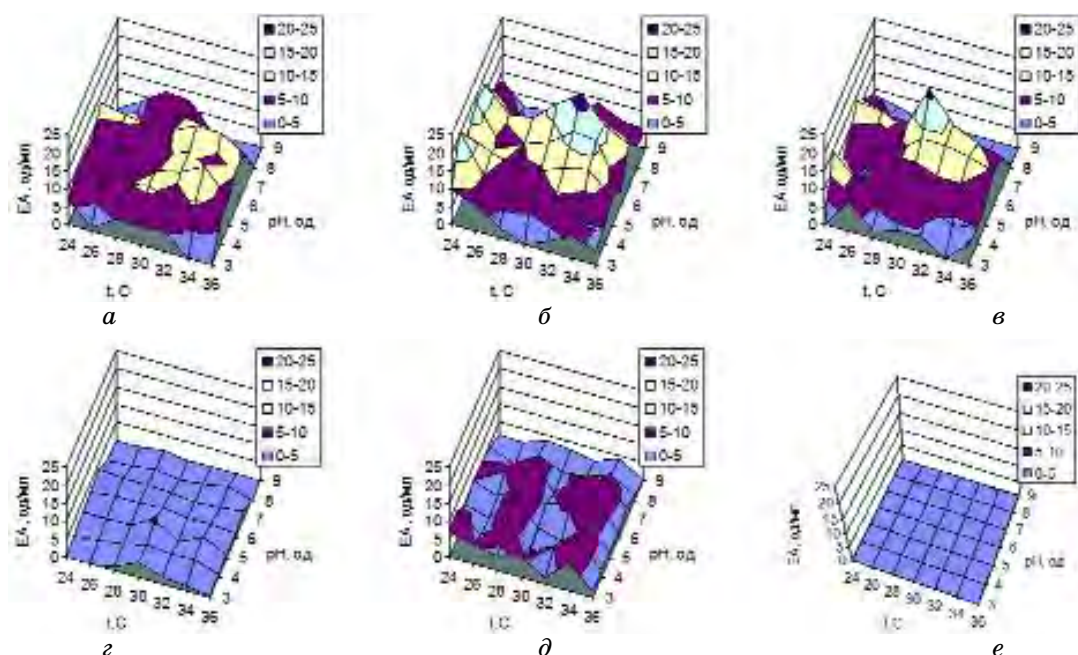


Рис. 1. Ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б та в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus pomaceus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту (тут і далі: у вставках наведено інтервали ендоглюканазної активності)

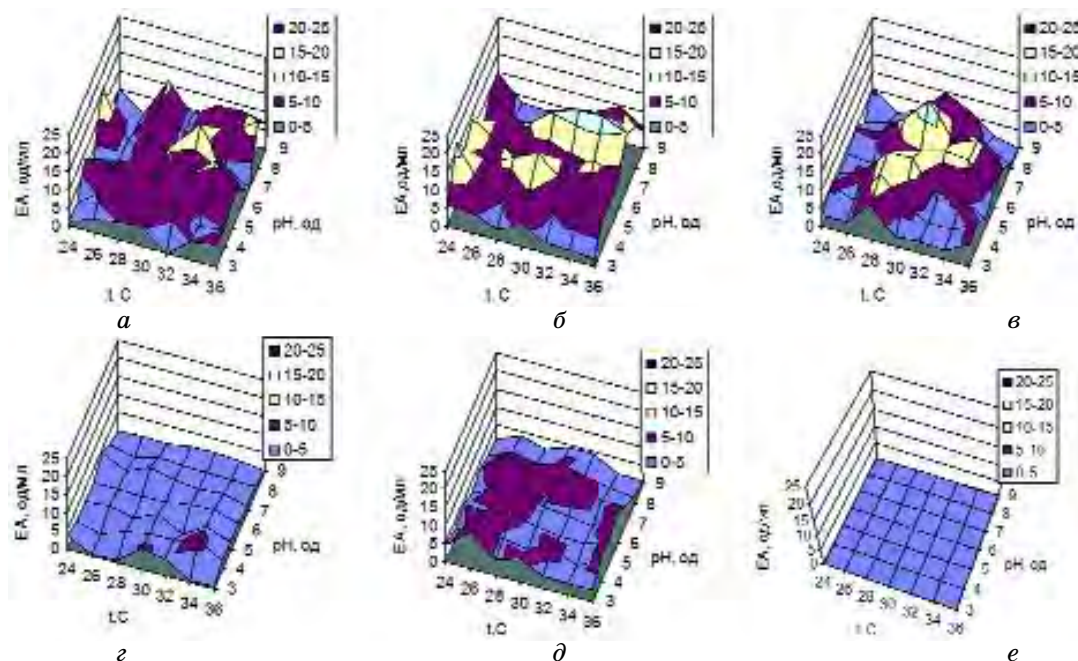


Рис. 2. Ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* (а, б і в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus pomaceus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

ензиму перевищувало ГЕЦ-активність КФ штаму А-Дон-02 *I. lacteus*, визначену за неоптимізованих умов, у 1,79 раза.

Як впливає з рис. 1, в, на 7-му добу культивування штаму Д-1 *I. lacteus* активність КФ щодо ГЕЦ є високою за культивування на живильних середовищах з рН 6–8 та температури

в межах 28–34 °С. На 14-ту добу експерименту діапазон максимальної активності залишався у тих самих температурних межах, але збільшувався за рахунок розширення меж значень рН живильних середовищ від 4 до 8 (рис. 2, в). Максимум ГЕЦ-активності штаму Д-1 *I. lacteus* встановлено на середовищі

з рН 7 за температури 30 °С. Оптимізоване значення ЕА КФ цієї культури щодо ГЕЦ перевищувало неоптимізоване у 2,15 раза.

У культури Sh-1 *S. hirsutum* визначено один характерний чіткий максимум активності КФ щодо ГЕЦ на 7-му добу (рис. 1, з) та два піки на 14-ту добу експерименту (рис. 2, з), утім, ці три значення достовірно між собою не відрізняються. На 14-ту добу культивування ЕА КФ цього штаму дещо зсувалась у бік більш високих значень кислотності (рН 3 і 4) та розділялась за оптимальною температурою (30 і 34 °С). При цьому максимальна ГЕЦ-активність КФ штаму Sh-1 *S. hirsutum* перевищувала неоптимізоване значення ЕА у 8,08 раза.

Залежність ЕА щодо ГЕЦ КФ штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* на 7-му добу культивування характеризується певною зональністю з мінімальною ГЕЦ-активністю за температур 26 та 30 °С (рис. 1, д), яка зникає на 14-ту добу експерименту (рис. 2, д), що можна пояснити пристосуванням синтетичного апарату культури до умов експерименту. На 7-му добу вирощування штаму значення ЕА вищі за встановлені на 14-ту добу культивування, максимальну ГЕЦ-активність визначено за культивування при температурі 34 °С на живильному середовищі з рН 7. Оптимізоване значення ЕА щодо ГЕЦ КФ штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* у 2,95 раза перевищувало значення за неоптимізованих умов.

ЕА КФ культури J-2An *P. rotaceus* стосовно розчинів ГЕЦ за умов дії різних значень рН і температури не виявлено в усіх варіантах дослідів (рис. 1, е та 2, е). Зважаючи на нормальний ріст штаму в культурі на картопляно-глюкозному середовищі, на середовищі Чапека з додаванням глюкози як джерела вуглецю (8 г/л) та накопичення в КФ екзогенних протеїнів у цьому разі, наявність ЕА у штаму J-2An *P. rotaceus* на попередньому етапі досліджень можна розглядати як артефакт, адже дані не відтворено за повторного проведення експерименту. Окрім того, втрату здатності цього штаму до розкладання целюлози взагалі та синтезу ендоглюканаз зокрема можна пояснити перебудовою ензиматичного апарату гриба, яка відбулася після введення його в культуру.

Паралельно з дослідженням загальної ЕА щодо ГЕЦ КФ досліджуваних базидіоміцетів розраховували також показники питомої ЕА. Результати розрахунків наведено на рис. 3 (7-ма доба культивування) і 4 (14-та доба експерименту). Значення питомої ЕА вищі за значення загальної активності, що свідчить про незначне накопичення протеїнів у КФ досліджуваних штамів. За умов дії різних гра-

дацій зазначених чинників питома ЕА штамів змінювалась відмінно від загальної ГЕЦ-активності, що вказує на неоднорідність накопичення протеїнів у КФ базидіоміцетів.

Для штаму K-1 *I. lacteus* як на 7-му (рис. 3, а), так і на 14-ту (рис. 4, а) добу культивування встановлено, що максимальна питома активність КФ щодо ГЕЦ припадає на близькі до граничних значень температури та рН. Абсолютний максимум питомої ГЕЦ-активності КФ цього штаму встановлено на 7-му добу культивування за температури 36 °С на живильному середовищі з рН 7. Оптимізоване значення питомої ЕА штаму K-1 *I. lacteus* перевищує неоптимізоване значення в 1,42 раза.

Питома ЕА штаму A-Дон-02 *I. lacteus* на 7-му добу культивування (рис. 3, б) відзначалась більш високими значеннями порівняно з питомою ГЕЦ-активністю цього штаму на 14-ту добу експерименту (рис. 4, б). Максимум питомої ЕА КФ штаму A-Дон-02 *I. lacteus* встановлено під час культивування за тих самих умов, що й у досліді із загальною ендоглюканазою активністю КФ цього штаму щодо ГЕЦ. За наведених умов дії фізико-хімічних чинників питома ГЕЦ-активність цієї культури в 2,52 раза перевищувала показник КФ штаму A-Дон-02 *I. lacteus*, встановлений в експерименті за неоптимізованих умов культивування.

З рис. 3, в видно, що високу питому ЕА щодо ГЕЦ у культури Д-1 *I. lacteus* виявляли на живильних середовищах з рН 8 під час культивування в межах температур 24–28 °С та на живильних середовищах з рН 7 за температур 30 °С і 34–36 °С, тобто зі зростанням температури культивування оптимальне значення початкового рН живильного середовища зсувається у більш кислий бік. На 14-ту добу культивування (рис. 4, в) така закономірність відсутня. Встановлено, що оптимальними умовами для синтезу штамом Д-1 *I. lacteus* позаклітинної ендоглюканаз, здатної до гідролізу ГЕЦ, є рН 7 і температура 30 °С. Максимум питомої активності визначено на 7-му добу експерименту. Значення питомої ЕА, встановлене за оптимізованих умов, перевищує неоптимізоване у 2,63 раза.

Питома ЕА штаму Sh-1 *S. hirsutum* як на 7-му (рис. 3, з), так і на 14-ту (рис. 4, з) добу експерименту характеризувалась низькими значеннями порівняно з іншими досліджуваними культурами грибів. Максимальне значення питомої ГЕЦ-активності, встановлене у процесі культивування на живильному середовищі з рН 5 та за температури 30 °С, перевищувало величину активності ензиму, отриману за неоптимізованих умов, у 5,22 раза.

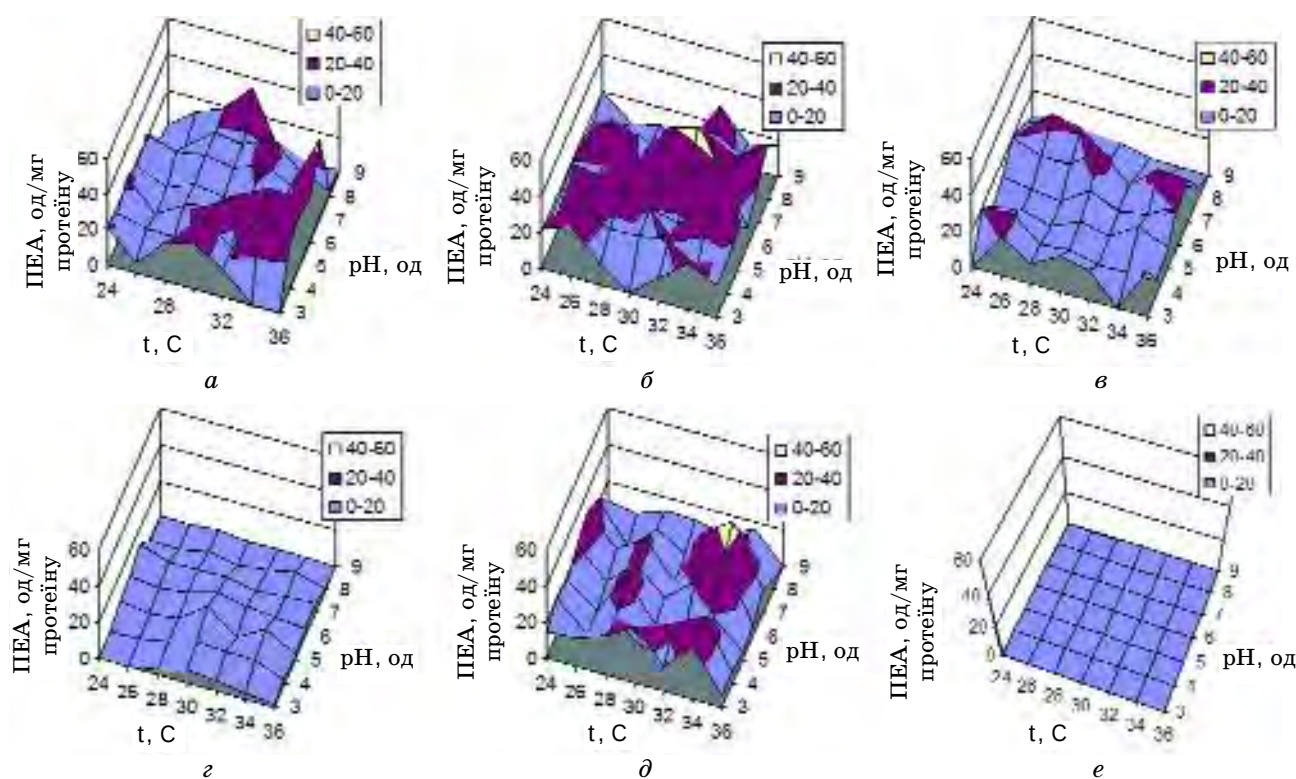


Рис. 3. Питома ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irrex lacteus* (а, б і в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту (тут і далі: ПЕА — питома ендоглюканазна активність)

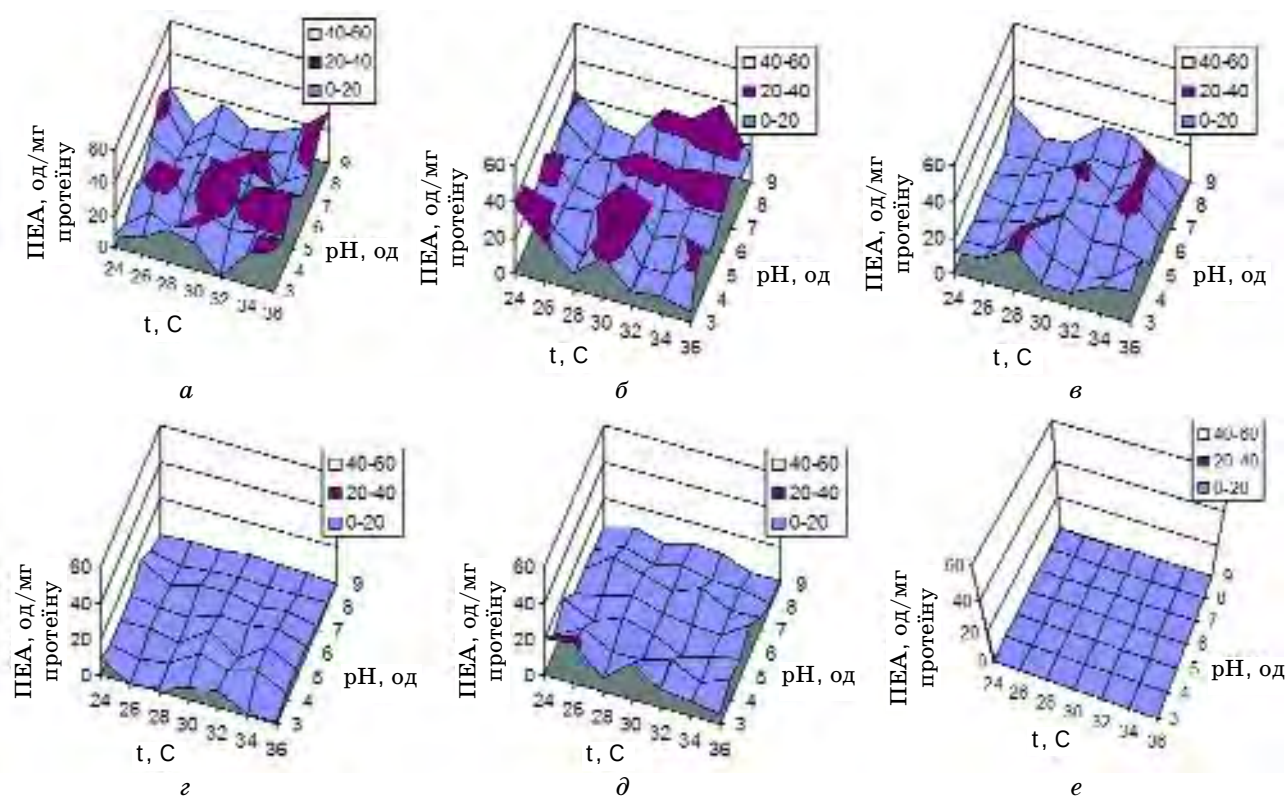


Рис. 4. Питома ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irrex lacteus* (а, б і в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

Для штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* встановлено аналогічну залежність питомої ендоглюканазної активності щодо ГЕЦ порівняно із загальною ендоглюканазною активністю КФ цього штаму (рис. 3, *δ* та 4, *δ*). Максимальне значення питомої ЕА цього штаму встановлено за аналогічних умов до загальної ГЕЦ-активності; оптимізоване значення в 16,67 раза перевищувало значення активності за неоптимізованих умов.

На рис. 3, *е* і 4, *е* показано, що для культури J-2An *P. rotaceus* не встановлено питомої ЕА стосовно розчинів ГЕЦ за умов дії різних значень рН і температури в усіх варіантах дослідю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Shapiro T. H. America's Energy Future: Technology and Transformation. — Washington: The National Academies Press, 2009. — 650 p.
2. Осадчая А. И., Сафронова Л. А., Авдеева Л. В. и др. Скрининг штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью // Микробиол. журн. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 41–48.
3. Zhang Y.-H. P., Himmel M. E., Mielenz J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies // Biotechnol. Adv. — 2006. — N 24. — P. 452–481.
4. Жданова Н. М., Олішевська С. В., Василевська А. І. та ін. Скринінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат // Микробиол. біотехнол. — 2008. — № 3. — С. 58–64.
5. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
6. Михайлова Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии. — Мн.: Бел. наука, 2007. — 407 с.
7. Baldrian P. Enzymes of saprotrophic basidiomycetes // Ecol. Saprot. Basidiom. — 2008. — V. 28. — P. 19–41.
8. Baldrian P., Valaskova V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. // FEMS Microbiol. Rev. — 2008. — N 32. — P. 501–521.
9. Zhang Y.-H. P., Himmel M. E., Mielenz J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies // Biotechnol. Adv. — 2006. — N 24. — P. 452–481.
10. Gregg D. J., Boussaid A., Saddler J. N. Techno-economic evaluation of generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle // Biores. Technol. — 1998. — N 63 (1). — P. 7–12.
11. Szijatro N., Siika-aho M., Tenkanen M. et al. Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces* // J. Biotechnol. — 2008. — N 136. — P. 140–147.
12. Ферментные системы высших базидиомицетов / Под ред. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
13. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнол. — 1993. — Т. 25. — 152 с.
14. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Учеб. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
15. Claeysens M., van Tilbeurgh H., Kamerling J. P. et al. Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM 4914. Substrate specificity and transfer activity of endoglucanase I // Biochem. J. — 1990. — N 270. — P. 251–256.
16. Niku-Paavola M.-L., Lappalainen A., Enari T.-M. et al. A new appraisal of the endoglucanases of the fungus *Trichoderma reesei* // Ibid. — 1985. — N 231. — P. 75–81.
17. Goyal A., Ghosh B., Eveleigh D. Characteristic of fungal cellulases // Biores. Technol. — 1991. — V. 36, N 1. — P. 37–50.
18. Keilich G., Bailey P. J., Afting E. G. et al. Cellulase (β -1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. Part II. Characterization. // Biochim. Biophys. Acta — Enzymology. — 1969. — V. 185, N 2. — P. 392–401.
19. El Ahwany A. M. D., Mohamed E. A. H. Enzymatic hydrolysis of pseudoplastic paint thickener (hydroxyethylcellulose) by a local isolate of *Aspergillus niger* // Afr. J. Biotechnol. — 2008. — V. 7 (20). — P. 3765–3770.
20. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity // Pure Appl. Chem. — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
21. Mullings R. Measurement of saccharification by cellulases // Enz. Microb. Technol. — 1985. — V. 7, N 12. — P. 586–591.
22. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.

23. Nelson N. A photometric adaptation of the Shomogyi method for the determination of glucose // J. Biol. Chem. — 1944. — V. 153, N 2. — P. 375–379.
 24. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.

25. Придєський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібник. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАЗИДИОМИЦЕТОВ — АКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ. III. ЭНДОГЛЮКАНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ ОТНОСИТЕЛЬНО ГИДРОКСИЭТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ

К. Г. Древаль, М. И. Бойко

Донецкий национальный университет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Проведен подбор условий культивирования базидиомицетов — активных продуцентов целлюлозолитических энзимов по показателям pH питательной среды (значения изменялись от 3 до 9 pH с интервалом 1 ед) и температуры (значения варьировали от 24 °C до 36 °C с интервалом 2 °C). Определяли активность эндоглюканазы (КФ 3.2.1.4) относительно гидроксиэтилцеллюлозы. Установлено, что оптимальной начальной кислотностью питательной среды для штаммов К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* и AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* является pH 7, а для штамма Sh-1 *Stereum hirsutum* — pH 5; оптимальная температура культивирования для штаммов Д-1 *Irpex lacteus* и Sh-1 *Stereum hirsutum* — 30 °C, для А-Дон-02 *Irpex lacteus* — 32 °C, для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — 34 °C, а для штамма К-1 *Irpex lacteus* — 36 °C. В результате оптимизации условий культивирования значения эндоглюканазной активности возросли в 1,43 раза для штамма К-1 *I. lacteus*, в 1,79 раза для А-Дон-02 *I. lacteus*, в 2,15 раза для Д-1 *I. lacteus*, в 2,95 раза для AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* и в 8,08 раза для штамма Sh-1 *S. hirsutum*. В то же время в результате подбора условий культивирования удельная эндоглюканазная активность относительно гидроксиэтилцеллюлозы штамма К-1 *I. lacteus* возросла в 1,42 раза, А-Дон-02 *I. lacteus* — 2,52 раза, Д-1 *I. lacteus* — в 2,63 раза, Sh-1 *S. hirsutum* — в 5,22 раза и штамма AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* — в 16,67 раза. Штамм J-2An *Phellinus pomaceus* не проявил эндоглюканазной активности ни в одном варианте опыта. Максимальная эндоглюканазная активность по отношению к гидроксиэтилцеллюлозе для всех штаммов установлена на 7-е сут культивирования.

Ключевые слова: базидиомицеты, эндоглюканаза, гидроксиэтилцеллюлоза, температура культивирования, кислотность среды, оптимизация, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.

CULTIVATION OF BASIDIOMYCETES — ACTIVE PRODUCERS OF CELLULOLYTIC ENZYMES. III. ENDOGLUCANASE ACTIVITY OF CULTURAL LIQUIDS TOWARDS HYDROXYETHYLCELLULOSE

K. G. Dreval, M. I. Boyko

Donetsk National University

E-mail: k.dreval@gmail.com

Selection of the cultivation conditions of basidiomycetes — active producers of cellulolytic enzymes was conducted along nutrient medium initial acidity (factor was changed between 3 and 9 pH with step of 1 pH) and cultivation temperature (factor was changed between 24 and 36 °C with step of 2 °C) to increase their endoglucanase (EC 3.2.1.4) production. In the selection process endoglucanase activity was determined using hydroxyethylcellulose as a substrate. It was determined, that optimal initial acidity of the nutrient medium for strains К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* is 7 pH, and for strain Sh-1 *Stereum hirsutum* — 5 pH; optimal cultivation temperature is 30 °C for strains Д-1 *Irpex lacteus* and Sh-1 *Stereum hirsutum*, 32 °C for strain А-Дон-02 *Irpex lacteus*, 34 °C for strain AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* and 36 °C for strain К-1 *Irpex lacteus*. As a result of optimization of culture conditions the values of endoglucanase activity increased at 1,43 times for strain К-1 *I. lacteus*, at 1,79 times for strain А-Дон-02 *I. lacteus*, at 2,15 times for strain Д-1 *I. lacteus*, at 2,95 times for strain AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* and at 8,08 times for strain Sh-1 *S. hirsutum*. At the same time, as the result of selection of culture conditions, specific endoglucanase activity of strain К-1 *I. lacteus* was increased in 1,42 times, А-Дон-02 *I. lacteus* — in 2,52 times, Д-1 *I. lacteus* — in 2,63 times, Sh-1 *S. hirsutum* — in 5,22 times and AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* — in 16,67 times. Culture J-2An *Phellinus pomaceus* haven't shown any endoglucanase activity towards hydroxyethylcellulose in any experiment. Maximal endoglucanase activity of enzymes in cultural liquids of all strains was established on the 7th day of cultivation.

Key words: basidiomycetes, endoglucanase, hydroxyethylcellulose, cultivation temperature, acidity of nutrient medium, optimization, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.