

УДК 577.152.321+663.11

ЦЕЛЮЛАЗИ З КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ БАЗИДІОМІЦЕТІВ

К. Г. Древалъ
М. І. Бойко

Донецький національний університет, Україна

E-mail: k.dreval@gmail.com

Получено 14.06.2012

Встановлено, що під час вирощування базидіоміцетів відбувається адсорбція целюлаз на субстраті культивування — фільтрувальному папері. Адсорбовані ензими можна елюювати буферним розчином з високою іонною силою, однак для визначення активності та використання цих ензимів їх слід перевести у розчин з концентрацією солей, близькою до нуля. Розроблено метод одержання ензимних препаратів целюлаз із культуральної рідини базидіоміцетів. Ензимні препарати з високим ступенем очищення одержували в 3 етапи (висолювання протеїнів — діаліз — гель-хроматографія). На основі розробленого методу отримано оригінальні препарати целюлаз базидіальних грибів штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*. Вони містили низку протеїнів, характеризувалися специфічними максимумами виходу з колонки целюлозолітичних ензимів та активністю. Однак спільним є один чіткий максимум виходу з колонки ендоглюканази або целобіаз, що може свідчити про те, що целюлозолітичні комплекси досліджуваних базидіоміцетів не містять множинних форм целюлаз, які б відрізнялися за своєю молекулярною масою. Застосування розробленого методу дало змогу одержати препарати, ступінь очищення яких порівняно з вихідним культуральним фільтратом становить 7,3 для ендоглюканази і 33,3 для целобіази штаму А-Дон-02 *I. lacteus*; 13,1 для ендоглюканази і 25,5 для целобіази штаму Д-1 *I. lacteus*; 29,9 для ендоглюканази і 90,1 для целобіази штаму К-1 *I. lacteus*; 2,1 для ендоглюканази і 30,6 для целобіази штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Ключові слова: базидіоміцети, целюлозолітичні ензими, ендоглюканаза, целобіаза, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.

Біотехнологія дає можливість одержувати необхідні продукти для різноманітних видів людської діяльності [1]. Один із напрямів цієї галузі передбачає утилізацію біоорганічної речовини за допомогою специфічних ензимів [2]. Біоконверсію відтворюваної рослинної сировини у паливо, кормові та харчові продукти, напівпродукти для хімічної та мікробіологічної промисловості у наш час розглядають як одну з ключових галузей біотехнології [1, 2]. Однією з основних причин, що стримує промислове впровадження біодеструкції целюлози, є відсутність високоактивних та економічно ефективних продуцентів ензимів целюлозолітичної дії [3–6]. Поряд із цим целюлозолітичні ензими є найбільш витратною ланкою в процесі біоконверсії целюлози [7].

Традиційними об'єктами одержання препаратів целюлозолітичної дії є аскоміцети та бактерії [8–11], однак останнім часом дедалі більше уваги приділяють базидіальним грибам, оскільки вони мають багато переваг перед традиційними продуцентами целюлаз [12, 13]. Нами знайдено низку

активних продуцентів целюлозолітичних ензимів серед базидіоміцетів, оптимізовано умови їх культивування та встановлено динаміку синтезу ними целюлаз, у результаті чого показано, що нові штами базидіальних грибів здатні конкурувати з традиційними об'єктами біотехнології целюлаз [14–16].

Для одержання препаратів целюлаз із культуральної рідини використовують загальноприйняті методи виділення та очищення ензимів, комбінуючи їх у різних варіантах [9, 10]. Отриманню целюлаз із культуральної рідини аскоміцетів та бактерій присвячено велику кількість робіт [9, 10, 17–20]. Однак методикам одержання целюлозолітичних ензимів базидіоміцетів приділено недостатньо уваги [21, 22]. Виділення, фракціонування та одержання целюлозолітичних ензимів є складним завданням, пов'язаним із розробленням у кожному конкретному випадку схеми виділення компонентів целюлазного комплексу та її оптимізації [9]. Аналіз показує, що для отримання високоочищеного ензиму потрібно 4–6

стадій [9, 10, 17–20, 23]. Для фракціонування целюлаз із різних організмів-продуцентів використовують відомі методи очищення протеїнів, серед яких найчастіше застосовуваними є осадження сульфатом амонію, етанолом або іншими органічними розчинниками, методи гель- та іонно-обмінної хроматографії, препаративне ізоелектрофокусування та електрофорез [9, 10, 24, 25]. Окрім того, аналіз даних літератури залишає відкритим питання дослідження целюлаз, що можуть адсорбуватися під час культивування грибів на субстраті в живильному середовищі, адже, як відомо [26], більшість целюлозолітичних ензимів мають субстратзв'язувальний домен, унаслідок чого відбувається їх адсорбція на субстраті [10].

Метою роботи було розроблення методу одержання комплексу екзоцелюлаз базидіоміцетів незалежно від ступеня їх адсорбції на субстраті культивування.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були 4 штами вищих базидіальних грибів: K-1, A-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt.

Для дослідження целюлозолітичної активності штами культивували на модифікованому живильному середовищі Чапека з використанням фільтрувального паперу як єдиного джерела вуглецю. Початкове рН живильного середовища доводили до оптимальних значень для кожного штаму [16] на аналізаторі іонів АІ-123 (Україна). Культивування проводили протягом 7 діб [15] за оптимальних для кожного штаму температур [16] у термостатах ТС-80 та ТС-80-М2 (Росія).

Активність ензимів целюлозолітичного комплексу визначали стосовно таких субстратів: фільтрувальний папір (Whatman № 1, щільність 80 г/м²) — загальна целюлозолітична активність (максимум загальної активності целюлаз у культуральних фільтратах стосовно фільтрувального паперу — ФПА), Na-карбоксиметилцелюлоза (С5678, Sigma, Німеччина), гідроксіетилцелюлоза (54290, Sigma, Німеччина) — ендоглюканазна активність та целобіоза (22150, Sigma, Німеччина) — целобіазна активність. Склад реакційних сумішей для визначення ензиматичної активності та умови проведення реакцій — відповідно до рекомендацій IUPAC [27] і загальноприйнятих методик [9, 10]. За одиницю активності (од) приймали

таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкмоль редукуючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв за стандартних умов. Питому активність (од/мг протеїну) визначали як відношення загальної активності культурального фільтрату (од/мл) до вмісту протеїну в культуральному фільтраті (мг/мл). Редукуючі цукри знаходили за методом Шомодї–Нельсона (калібрувальну криву побудовано за глюкозою) [28], а глюкозу — глюкозооксидазно-пероксидазним методом з використанням набору реактивів для визначення глюкози у біологічних рідинах («Реагент», Україна). Вміст протеїну в КФ встановлювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [29].

Штами культивували поверхневим способом у конічних колбах об'ємом 1 000 мл, куди розливали по 500 мл живильного середовища. Осадження протеїнів з культурального фільтрату (КФ) проводили методом висолювання [30], додаючи сульфат амонію до 100%-го насичення, після чого розчин витримували за температури +6±1 °С упродовж 3 діб. Протеїн, який випадав у осад, відділяли від супернатанта на центрифугах ЦЛР-1 протягом 15 хв при 8000 об/хв (температура +6±1 °С). Осад діалізували через напівпроникну мембрану, використовуючи целофан, який пропускає речовини з молекулярною масою до 10 кДа [31] проти дистильованої води за температури +6±1 °С.

Гель-хроматографію розчинів, які отримували після діалізу, здійснювали на колонках діаметром 1 см, висота шару сорбенту Sephadex G-75 (Sigma, Німеччина) становила 30 см. Елюентом слугувала дистильована вода, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракцій — 2 мл. Вміст протеїнів визначали спектрофотометрично.

Ступінь очищення ензимних препаратів визначали як відношення активності ензиму на певному етапі очищення до його активності в початковому культуральному фільтраті [32].

Усі дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх — методом Дункана [33].

Результати та обговорення

Для дослідження адсорбції целюлаз на субстраті — фільтрувальному папері, який залишався після культивування за оптимальних умов штаму A-Дон-02 *Irpex lacteus*

на оптимізованому живильному середовищі протягом 7 діб, фільтрувальний папір відділяли від культуральної рідини за допомогою фільтра Шотта (пор 100). Оскільки для визначення целюлозолітичної активності відповідно до вимог IUPAC використовують цитратний буфер [27], його було обрано для десорбції ензимів із субстрату. Отриманий фільтрувальний папір заливали 3–4-кратним об'ємом 0,5 М цитратного буфера (рН=4,8) і залишали на 24 год за температури $+6\pm 1$ °С. Після цього знову здійснювали фільтрування на тому самому фільтрі. Елюат не виявляв целюлозолітичної активності, однак містив значну кількість протеїну (0,48 мг/мл). Нами зроблено припущення, що ензими, які елюювались із фільтрувального паперу, не виявляли своєї активності через високу іонну силу та концентрацію буферного розчину. Тому до розчину елюату додавали сульфат амонію до 100% -го насичення з метою осадження усіх протеїнів. Осадження, відділення протеїну від супернатанта та наступний їх діаліз проводили, як описано в розділі «Матеріали і методи». У результаті отримано водний розчин протеїнів елюату (концентрація протеїнів — 0,155 мг/мл), в якому визначили активність ензимів (од/мг протеїну):

ФПА	1,16
Ендоглюканазна	178
Целобіазна	948,77.

Встановлено, що під час вирощування базидіоміцетів відбувається адсорбція целюлаз на субстраті культивування — фільтрувальному папері. Адсорбовані ензими можна елюювати буферним розчином з високою іонною силою, однак для визначення активності та використання цих ензимів їх слід перевести у розчин з меншою концентрацією солей.

Наступну роботу було присвячено підбору методів одержання очищених препаратів целюлаз із культуральної рідини базидіоміцетів на прикладі штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus*.

Зважаючи на те, що процес гідролізу целюлози є складним та багатоступеневим [10], потрібна низка ензимів, тому для висолування протеїнів із культурального фільтрату додавали сульфат амонію до 100% -го насичення з метою осадження усіх протеїнів культуральної рідини. Осадження, відділення протеїнів від супернатанта та наступний їх діаліз проводили, як описано в розділі «Матеріали та методи». У результаті отримували водний розчин протеїнів культуральної рідини штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* (концентрація протеїнів 0,760 мг/мл),

позбавлений низькомолекулярних сполук, який виявляв целюлозолітичну активність (од/мг протеїну):

ФПА	24,30
Ендоглюканазна	69,74
Целобіазна	424,58.

В результаті змішування розчину протеїну після діалізу культуральної рідини з розчином протеїну після діалізу елюату з фільтрувального паперу отримано ензимний препарат з концентрацією протеїнів 0,398 мг/мл. Активність целюлаз цього препарату мала такі значення (од/мг протеїну):

ФПА	24,17
Ендоглюканазна	133,51
Целобіазна	665,10.

Значення активності целюлаз препарату не є простою сумою активності першого та другого діалізатів, що ще раз доводить взаємовплив компонентів целюлозолітичного комплексу на активність один одного та підтверджує складність взаємодій целюлаз між собою.

З метою подальшого очищення препарат — суміш діалізатів культуральної рідини та елюату з фільтрувального паперу — використовували для нанесення на колонку, заповнену сорбентом Sephadex-75 (рис. 1). Було встановлено, що протеїн виходить з максимумом активності у фракціях 5 та 11. ФПА виявлено у фракціях 8–11 з максимумом у 10-й фракції, ендоглюканазну активність — у фракціях 7–11 з максимумом у 10-й фракції, а целобіазну активність — у фракціях 6–11 з максимумом у 9-й фракції. У фракції 5, відповідно до теоретичних розрахунків [34], виходять сполуки, які за своєю масою знаходяться поза роздільною здатністю цієї колонки, тобто з молекулярною масою понад 70 кДа.

Об'єднанням фракцій 6–11 отримано препарат целюлаз штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* з концентрацією протеїнів 43 мкг/мл і такими значеннями активності:

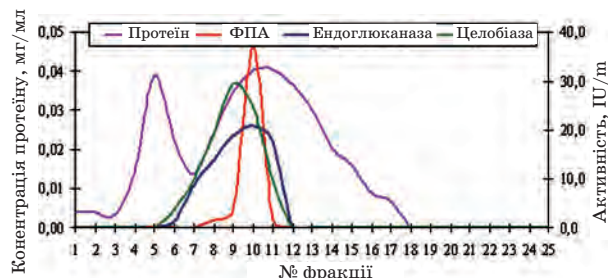


Рис. 1. Хроматограма препарату целюлаз штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* на колонці із Sephadex G-75:

розмір колонки 10×300 мм;
швидкість потоку — 20 мл/год;
об'єм фракції — 2 мл

Загальна целюлозолітична	4,19
Ендоглюканазна	590,00
Целобіазна	912,09.

ФПА ензимного препарату штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* зменшується після очищення його гель-фільтрацією, що можна пояснити розділенням компонентів целюлазного комплексу. Водночас активність ендоглюканази та целобіази зростає, і ступінь очищення цих ензимів порівняно з вихідним культуральним фільтратом становить 7,3 для ендоглюканази та 33,3 — для целобіази.

Таким чином встановлено, що під час культивування базидіоміцетів целюлази адсорбуються на субстраті вирощування — фільтрувальному папері. На підставі отриманих результатів розроблено метод одержання ензимного препарату целюлаз із культуральної рідини базидіоміцетів, який схематично можна зобразити так:



Принципово новим для такого способу є елюція целюлаз із субстрату культивування базидіоміцетів.

Відповідно до розробленої методики було отримано препарати целюлозолітичних ензимів штамів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*. Хроматограми об'єднаних діалізатів подано на рис. 2, 3 та 4 відповідно.

Як видно, протеїн з об'єднаного діалізату штаму Д-1 *Irpex lacteus* виходить з 4 піками, один з яких (фракція № 3) є сукупністю протеїнів, що виходять за межі розділення такої колонки. Фракції 5–10 із целюлозолітичною активністю чітко збігаються з другим піком протеїну, що свідчить про те, що целюлази цього штаму близькі до верхньої межі розділення колонки, тобто їх молекулярна маса становить близько 70 кДа.

Об'єднаний діалізат штаму К-1 *Irpex lacteus* не містив протеїнів з молекулярною масою понад 70 кДа, що впливає із відсутності протеїну у 3-й фракції хроматограми цього штаму (рис. 3). Однак діалізат штаму К-1 *I. lacteus* містив багато низькомолекулярних сполук з молекулярною масою менше 3 кДа, які виходили після 17-ї фракції. Ці низькомолекулярні сполуки можуть бути продуктами гідролізу або денатурації протеїнів культуральної рідини зазначеного штаму. Всього отримано 5 піків протеїну, а целюлозолітична активність поєднана з першими двома з них. Отже, целюлази штаму К-1 *I. lacteus* виходили у 5–11-й фракціях.



Рис. 2. Хроматограма препарату целюлаз штаму Д-1 *Irpex lacteus* під час пропускання його через колонку із Sephadex G-75: розмір колонки 10×300 мм, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракції — 2 мл

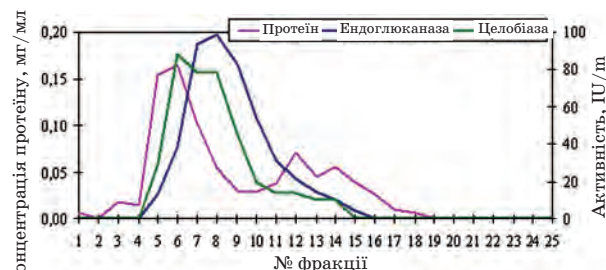


Рис. 3. Хроматограма препарату целюлаз штаму К-1 *Irpex lacteus* під час пропускання його через колонку із Sephadex G-75: розмір колонки 10×300 мм, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракції — 2 мл

Під час гель-хроматографії об'єднаного діалізату штаму AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* одержано 4 піки протеїну, а його целюлази характеризувалися ширшим порівняно з іншими базидіоміцетами діапазоном виходу фракцій з колонки (рис. 4). Пік ендоглюканазної активності цього штаму виходить на дві фракції пізніше порівняно із целобіазною активністю, однак перша та остання фракції ензимів збігались (5–14).

Таким чином, об'єднані діалізати базидіоміцетів містили різні за своєю молеку-

лярною масою протеїни, характеризувалися специфічними максимумами виходу целюлозолітичних ензимів та активністю. Однак спільним для всіх ензимних препаратів є один чіткий максимум виходу з колонки ендоглюканаза або целобіаза, що може свідчити про те, що целюлозолітичні комплекси досліджуваних базидіоміцетів не містять множинних форм целюлаз, які б відрізнялися за своєю молекулярною масою.

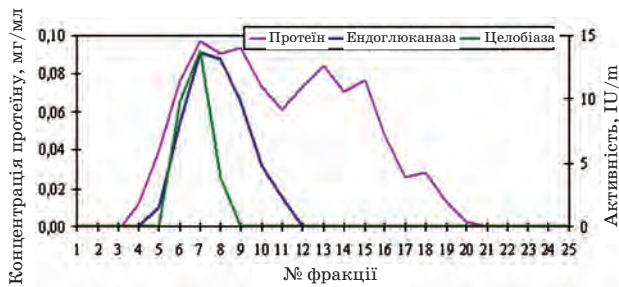


Рис. 4. Хроматограма препарату целюлаз штаму AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* під час пропускання його через колонку з Sephadex G-75:

розмір колонки 10×300 мм, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракції — 2 мл

Дані щодо активності целюлаз штамів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* на кожному етапі одержання препарату наведено в табл. 1 (подано середні арифметичні величини, відхилення від середнього арифметичного не перевищувало 5%).

Таблиця 1. Целюлозолітична активність ензимних препаратів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* на різних етапах очищення (од/мг протеїну)

Досліджений розчин	Ендоглюканазна активність	Целобіазна активність	Ступінь очищення	
			Ендоглюканази	Целобіази
<i>Д-1 Irpex lacteus</i>				
Вихідний КФ	78,44	60,20	1	1
Діалізат КФ	243,54	300,11	3,1	4,99
Діалізат елюату	168,90	558,99	-	-
Об'єднаний діалізат	119,83	164,07	-	-
Об'єднана фракція гель-хроматографії	1030,00	1531,88	13,13	25,45
<i>К-1 Irpex lacteus</i>				
Вихідний КФ	44,31	20,05	1	1
Діалізат КФ	104,87	76,51	2,37	3,82
Діалізат елюату	63,62	464,42	-	-
Об'єднаний діалізат	194,74	338,32	-	-
Об'єднана фракція гель-хроматографії	1327,93	1807,24	29,97	90,13
<i>AnSc-1 Daedaleopsis confragosa</i> f. <i>confragosa</i>				
Вихідний КФ	82,88	15,74	1	1
Діалізат КФ	105,40	222,35	1,27	14,13
Діалізат елюату	115,53	368,57	-	-
Об'єднаний діалізат	134,43	404,6	-	-
Об'єднана фракція гель-хроматографії	174,91	481,53	2,11	30,60

Для оцінювання перспективи використання препаратів екзоцелюлаз базидіоміцетів проведено порівняння їх з даними літератури щодо активності целюлаз із різних організмів-продуцентів (табл. 2). Відтак можна стверджувати, що одержані препарати целюлаз базидіальних грибів штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* є більш активними порівняно з існуючими аналогами і можуть бути використані в різноманітних галузях біотехнології (біоутилізація целюлозовмісних відходів, силосування кормів для сільського господарства, целюлозно-паперова промисловість тощо).

Таким чином, розроблено метод отримання повного комплексу екзоцелюлаз базидіоміцетів незалежно від ступеня їх адсорбції на субстраті культивування. Новизна методу полягає в елюції целюлаз 0,5М цитратним буферним розчином (рН = 4,8) із субстрату культивування базидіоміцетів. Одержання оригінальних препаратів целюлаз базидіальних грибів штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* з високим ступенем очищення слід проводити в 3 етапи (висолювання протеїнів — діаліз — гель-хроматографія).

Роботу виконано за спонсорської підтримки суспільної організації «Развитие» (Росія).

Таблиця 2. Целюлозолітична активність препаратів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* порівняно з іншими препаратами (дані літератури)

Препарат	Організм-продуцент	Протеїн, мг/мл	Субстрат для визначення активності			Літера- тура
			ФП	Na-КМЦ	Ц	
А-Дон-02	<i>Irpex lacteus</i>	0,04	4,19	590,0	912,1	
Д-1		0,03	0	1030,0	1531,9	
К-1		0,03	0	1327,9	1807,2	
AnSc-1	<i>Daedaleopsis confragosa</i> f. <i>confragosa</i>	0,16	5,60	174,9	481,5	
Rovabio Excel	<i>Penicillium funiculosum</i>	27	1,32	24,8	50,8	[35]
Beta-Glucanase 200L		9	0,58	20,9	20,9	[35]
Б-1	<i>Coriolus hirsutus</i>	–	17,8	13,7	18,0	[36]
UV-64 ВКМ F-3932D	<i>Myceliophthora fergusii</i>	–	–	2,75	2,32	[37]
258	<i>Thielavia terrestris</i>	–	1,8	8,0	1,2	[39]
PV2007	<i>P. verruculosum</i>	–	–	32,1	1,8	[39]
Accellerase 1000	<i>Trichoderma</i>	–	–	23,8	3,8	[39]
Spezyme CP		–	–	21,9	0,4	[39]

Примітка. ФП — фільтрувальний папір; Na-КМЦ — Na-карбоксиметилцелюлоза; Ц — целобіоза. Значення активності наведено в од/мг протеїну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волова Т. Г. Биотехнология. — Новосибирск: Изд-во Сиб. отделения РАН, 1999. — 252 с.
2. Іншина М. Н. Біотехнологія: Навч. посібник. — Суми: Вид-во СумДПУ ім. А. С. Макаренка, 2009. — 172 с.
3. Кухар В. П. Біоресурси — потенційна сировина для промислового органічного синтезу // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 12–27.
4. Banerjee G., Scott-Craig J. S., Walton J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective // Bioen. Res. — 2010. — N 3. — P. 82–92.
5. Demain A. L. Biosolution to the energy problem // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — N 36. — P. 319–332.
6. Lin Y., Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects // Appl. Microbiol. Biotech. — 2006. — N 69. — P. 627–642.
7. Wilson D. B. Cellulases and biofuels // Cur. Opin. Biotechnol. — 2009. — V. 20. — P. 295–299.
8. Чешикова А. В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха: Учеб. пособие для вузов. — Иваново: ГОУВПО ИГХТУ, 2007. — 282 с.
9. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целюлозолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. — 1993. — Т. 25. — 152 с.
10. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
11. Рабинович М. Л. Производство этанола из целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42, № 1. — С. 5–32.
12. Трутнєва І. А., Дудченко Л. Г., Горова Т. Л. Ферментні препарати з вищих базидіальних грибів у біотехнологічних процесах // Фітотерапія. Часопис. — 2004. — № 3. — С. 43–49.
13. Novotny C., Cajthaml T., Svobodova K. et al. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential — review // Folia Microbiol. — 2009. — N 54 (5). — P. 375–390.
14. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
15. Древаль К. Г., Кузнецова К. В., Юдіна А. В. та ін. Динаміка синтезу целюлаз вищими дереворуйнівними базидіальними грибами // Мікробіол. біотехнол. — 2011. — № 4 (16). — С. 52–60.
16. Древаль К. Г., Бойко М. І. Культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів. І. Загальна

- целюлозолітична активність культуральних фільтратів базидіоміцетів // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 1. — С. 107–114.
17. Eriksen J., Goksuyr J. Cellulases from *Chaetomium thermophile* var. *dissitum* // Eur. J. Biochem. — 1977. — V. 77 — P. 445–450.
 18. Gum E. K., Brown R. D. Comparison of four purified extracellular 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viride* // Biochim. Biophys. Acta. — 1977. — V. 492, N 1. — P. 225–231.
 19. Nidetzky B., Steiner W., Claeysens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis // Biochem. J. — 1994. — V. 303. — P. 817–823.
 20. Daniel J. D., Simonetti A., Hertz P. F. et al. Purification and Characterization of an Extracellular b-glucosidase from *Monascus purpureus* // J. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 18 (5). — P. 933–941.
 21. Ферментные системы высших базидиомицетов / Под ред. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
 22. Комарницький І. К. Изучение целлюлозолитических ферментов у некоторых деразрушающих грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия». — К., 1975. — 28 с.
 23. Ding S. Jn., Ge W., Buswell J. A. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvaceae*. Purification, characterization, cloning and expression // Europ. J. Biochem. — 2001. — V. 268. — P. 5687–5695.
 24. Ishikawa E., Sakai T., Ikemura H. et al. Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis*-galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production // J. Biosci. Bioengin. — 2005. — V. 99, N 4. — P. 331–339.
 25. Magalhaes P. O., Ferraz A., Milagres A. F. Enzymatic properties of two b-glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 101. — P. 480–486.
 26. Рабинович М. Л., Мельник М. С. Прогресс в изучении целлюлозолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Усп. биол. химии. — 2000. — Т. 40. — С. 205–266.
 27. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity // Pure Appl. Chem. — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
 28. 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.
 29. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
 30. Броницкая З. С., Горетов В. П. Высаливание белков серноокислым аммонием при низких температурах // Прикл. биохим. микробиол. — 1967. — Т. 3, № 6. — С. 707–710.
 31. Кейл Б. Лабораторная техника органической химии. — М.: Мир, 1966. — С. 194–200.
 32. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Т. 1 — 392 с.
 33. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібник. — Донецьк: Касіопея, 1999. — 210 с.
 34. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии: Учеб. пособие для студентов биологических специальностей университетов. — М.: Высш. школа, 1980. — 272 с.
 35. Скомаровский А. А., Марков А. В., Гусаков А. В. и др. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42, № 6. — С. 674–680.
 36. Мельничук Г. Г., Даниляк М. І., Колеснева Г. В. Порівняльне вивчення целюлаз і глюкоамілаз грибів з родини *Polyporaceae* // Укр. бот. журн. — 1982. — Т. 39, № 2. — С. 13–16.
 37. А. с. 2361915 *России*. Штамм мицелиального гриба *Myceliophthora fergusii* — продуцент нейтральных целлюлазы, бета-глюканазы и ксиланазы / Синецын А. П., Окунев О. Н., Черноглазов В. М. и др. Заявка № 2008101252 от 21.01.2008, кл. C12N 1/14, C12N 9/42, Бюл. от 20.07.2009.
 38. А. с. 22477 *України*. Штам гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et. Cain, 258 — продуцент целлюлазного комплексу з нуклеодеполімеразною активністю / Сирчін С. О., Айзенберг В. Л., Захарченко В. О. та ін. Заявка № 95062987 від 26.06.1995, кл. C12N 1/14? C12P 21/00? A23K 3/02? <.k/ # 3/1998? dil 03/03/1998/
 39. А. с. 2361918 *России*. Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* — продуцент комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы и способ получения ферментного препарата комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы / Синецын А. П., Окунев О. Н., Черноглазов В. М. и др. Заявка № 2008106829 от 26.02.2008, кл. C12N 9/42, C12P 19/00, C12R 1/80, Бюл. от 20.07.2009.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

К. Г. Древал
М. И. Бойко

Донецкий национальный университет,
Украина

E-mail: k.dreval@gmail.com

CELLULASES FROM THE BASIDIO- MYCETES CULTURAL LIQUID

K. G. Dreval
M. I. Boyko

Donetsk National University,
Ukraine

E-mail: k.dreval@gmail.com

Установлено, что во время выращивания базидиомицетов происходит адсорбция целлюлаз на субстрате культивирования — фильтровальной бумаге. Адсорбированные энзимы можно элюировать буферным раствором с высокой ионной силой, однако для определения активности и использования этих энзимов их следует перевести в раствор с концентрацией солей, близкой к нулю. Разработан метод получения энзимных препаратов целлюлаз из культуральной жидкости базидиомицетов. Энзимные препараты с высокой степенью очистки получали в 3 этапа (высаливание протеинов — диализ — гель-хроматография). На основе разработанного метода получены оригинальные препараты целлюлаз базидиальных грибов штаммов К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* и AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*. Они содержали ряд протеинов, характеризовались специфическими максимумами выхода из колонки целлюлозолитических энзимов и активностью. Однако общим является один четкий максимум выхода из колонки эндоглюканаз или целлобиаз, что может свидетельствовать об отсутствии в целлюлозолитических комплексах исследуемых базидиомицетов множественных форм целлюлаз, отличающихся по своей молекулярной массе. Использование разработанного метода позволило получить препараты, степень очистки которых по сравнению с исходным культуральным фильтратом составляет 7,3 для эндоглюканазы и 33,3 для целлобиазы штамма А-Дон-02 *I. lacteus*; 13,1 для эндоглюканазы и 25,5 для целлобиазы штамма Д-1 *I. lacteus*; 29,9 для эндоглюканазы и 90,1 для целлобиазы штамма К-1 *I. lacteus*; 2,1 для эндоглюканазы и 30,6 для целлобиазы штамма AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Ключевые слова: базидиомицеты, целлюлозолитические энзимы, эндоглюканаза, целлобиаза, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.

Adsorption of cellulases on substrate taking place during the cultivation process was determined. Adsorbed enzymes can be eluted by buffer solution with high ionic strength, but for determine their activity they should be transferred into the aqueous solution. On the basis of the results a method for obtaining of cellulases preparations from cultural liquids of basidiomycetes was developed. This method is the elution of cellulases from the cultivation substrate of basidiomycetes. It was found that using of the last allows to obtain enzymatic preparations with a high degree of purification in 3 stages (salting out of proteins — dialysis — gel chromatography). Cellulase preparations received original products of basidiomycetes strains К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* were obtained. They contained different proteins, enzymes with specific peaks out of column and their activity. However, common to them was a distinct maximum of outing from the column by endoglucanases or cellobiases, which may indicate that the studied cellulolytic complexes of basidiomycetes do not contain multiple forms of cellulases with different molecular mass. This method allowed to obtain preparations with different degree of purification in comparing with the original culture filtrate 7,3 for endoglucanase and 33,3 for cellobiase of strain А-Дон-02 *I. lacteus*; 13,1 for endoglucanase and 25,5 for cellobiase of strain Д-1 *I. lacteus*; 29,9 for endoglucanase and 90,1 for cellobiase of strain К-1 *I. lacteus*; 2,1 for endoglucanase and 30,6 for cellobiase of strain AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Key words: basidiomycetes, cellulolytic enzymes, endoglucanase, cellobiase, enzymatic preparations, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.