

УДК 582.284:577.151.52

О.В. Чемерис

ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *IRPEX LACTEUS* (FR.) FR. ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПШЕНИЧНОЙ СОЛОМЕ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Донецкий национальный университет»

Представлены результаты исследования целлюлозолитической активности пяти штаммов дереворазрушающего базидиального гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., выделенных из природных плодовых тел и хранящихся в Коллекции культур кафедры физиологии растений Донецкого национального университета и в Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины под номерами 1080, 1082, 1631, 1632 и 2434. При твердофазном культивировании на лигноцеллюлозном субстрате – пшеничной соломе штаммы *I. lacteus* проявили разную степень разложения субстрата – от 20 до 42,2 %, целлюлозолитическую – от 0,23 до 12,01 Ед/мг и эндогликаныазную активность – от 15,2 до 648,56 Ед/мг. Наиболее перспективными продуцентами энзимов целлюлозолитического комплекса являются штаммы *I. lacteus* 1082, 1631 и 2434.

Ключевые слова: *Irpex lacteus*, целлюлозолитическая активность, твердофазное культивирование, пшеничная солома

Цитирование: Чемерис О.В. Целлюлозолитическая активность штаммов *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. при твердофазном культивировании на пшеничной соломе // Промышленная ботаника. 2021. Вып. 21, № 1. С. 28–35.

Введение

С развитием современных направлений биотехнологии ксилотрофные базидиальные грибы становятся более доступным источником экзогенных ферментов. Представители различных таксономических и экологических групп базидиальных грибов характеризуются близким составом внеклеточных ферментов, штаммовой и видовой изменчивостью [8, 17]. Наличие широкого спектра окислительных и гидролитических ферментов, отвечающих за расщепление лигноцеллюлозного комплекса растительного субстрата, открывает широкие перспективы практического применения базидиомицетов в качестве деструкторов сложных биополимеров [7], а природа ростового субстрата и условия культивирования продуцента оказывают значительное влияние на синтез им дереворазрушающего комплекса ферментов [6, 7].

Одним из важных вопросов современной биотехнологии является разработка способов культивирования продуцентов биологически активных веществ. Так, наиболее традиционным считается глубинный способ культивирования – легко воспроизводимый и эффективный метод получения мицелия и метаболитов [5, 6, 22]. Альтернативой глубинному способу культивирования в последние годы стало твердофазное культивирование, активно применяющееся в производстве биологически активных вторичных метаболитов [1], кормов [12, 14], топлива [23], пищевых [3, 4] и фармацевтических продуктов [6]. Выбор подходящего субстрата – ключевой аспект твердофазной ферментации. Твердый материал выполняет функцию физической поддержки и источника питательных веществ для продуцента. В качест-

ве субстратов в процессах твердофазного культивирования используют малоценное вторичное растительное сырье – отходы агропромышленного комплекса [13, 21] и деревообрабатывающей промышленности [12, 21].

Наиболее изучены ферментные комплексы целлюлаз представителей высших грибов *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. [2], *Cerrena maxima* (Mont.) Ryvarden, *Coriolus zonatus* (Nees) Qué1. [13] и др. Базидиальный гриб *Irpex lacteus* Fr. (Fr.) в этом плане изучен недостаточно, однако способен к синтезу ферментов целлюлазного комплекса [3]. Ранее было показано, что культуральные жидкости штаммов *I. lacteus* при жидкофазном культивировании на хроматографической бумаге [3] и пшеничной соломе [15] в качестве ростового субстрата проявляют выраженное целлюлозолитическое действие. Причем изменение параметров жидкофазного культивирования штаммов *I. lacteus* оказывает влияние на процесс формирования целлюлазного комплекса [15, 16]. Это позволяет рассматривать гриб *I. lacteus* в качестве доступного источника высокоактивных и стабильных экзогенных ферментов дереворазрушающего комплекса.

Однако в литературе отсутствуют данные о твердофазной ферментации лигноцеллюлозного субстрата грибом *I. lacteus*. В связи с этим актуальными являются исследования по поиску и отбору штаммов данного продуцента с высоким выходом ферментов целлюлозолитического действия при твердофазном культивировании.

Цель и задачи исследований

Целью данной работы является изучение целлюлозолитической активности гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. при твердофазном культивировании на лигноцеллюлозном субстрате – пшеничной соломе. Задачи: оценить степень биodeградации пшеничной соломы штаммами *I. lacteus*, исследовать активность целлюлозолитических ферментов штаммов *I. lacteus* при твердофазном культивировании.

Объекты и методики исследований

Объектами исследования являлись пять штаммов гриба *I. lacteus*, чистые культуры которых были выделены из природных плодовых тел и хранятся в Коллекции культур кафедры физиологии растений Донецкого национального университета

и в Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины под номерами 1080, 1082, 1631, 1632 и 2434.

Штаммы *I. lacteus* культивировали в течение 30 суток при температуре 32 °С в колбах Эрленмейера объемом 100 мл на пшеничной соломе, предварительно измельченной до конечного размера частиц 0,5–0,7 см. В каждую колбу вносили 2 г воздушно-сухой пшеничной соломы и 20 мл дистиллированной воды и стерилизовали в автоклаве при 0,8 атм в течение 40 минут. Инокуляцию лигноцеллюлозного субстрата проводили кусочком мицелия штаммов *I. lacteus* размером 5×5 мм.

Активность ферментов целлюлазного комплекса определяли в культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* через каждые 5 суток, начиная с 5-х по 30-е сутки культивирования. Внеклеточные ферменты целлюлозолитического действия экстрагировали 20 мл холодной дистиллированной воды. Экстракцию проводили в течение 1 ч. Полученную культуральную жидкость центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 5 мин для удаления частиц субстрата и мицелия.

Интенсивность разложения лигноцеллюлозного субстрата штаммами *I. lacteus* оценивали по убыли сухой биомассы субстрата.

Активность ферментов целлюлозолитического комплекса штаммов *I. lacteus* определяли относительно таких субстратов: фильтровальная бумага (Filtrak, плотность 90 г/м²) – общая целлюлозолитическая активность, Na-карбоксиметилцеллюлоза (C5678, Sigma, США) – эндоглюканазная активность. Состав реакционных смесей для определения целлюлозолитической активности и условия проведения реакций соответствовали общепринятым методикам [10, 11, 19]. За единицу целлюлозолитической активности (Ед) принимали такое количество фермента, которое образовывало 1 mol редуцирующих сахаров на протяжении 1 ч в условиях опыта (t = +37 °С, pH 4,2). Удельную активность (Ед/мг) определяли отношением общей активности культуральной жидкости (Ед/мл) к содержанию белка в культуральной жидкости (мг/мл). Редуцирующие сахара определяли методом Шомодьи-Нельсона (калибровочный график строили по глюкозе) [10, 11, 19, 20].

Содержание белка в культуральной жидкости определяли по методу Бредфорда [18].

Все исследования проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку полу-

ченных данных осуществляли методом дисперсионного анализа качественных и количественных признаков, а сравнение средних арифметических величин – по критерию Дункана [9].

Результаты исследований и их обсуждение

На 5-е сутки твердофазного культивирования штаммов *I. lacteus* 1080, 1082 и 1632 степень разложения пшеничной соломы составляла ~8 %, штаммов *I. lacteus* 1631 и 2434 – 16,8 % и 14,5 % соответственно (рис. 1).

ной соломы штаммами *I. lacteus* осуществлялись более интенсивно, чем при жидкофазном [16].

Установлено, что удельная целлюлозолитическая активность относительно фильтровальной бумаги штаммов *I. lacteus* при твердофазном культивировании значительно отличалась (рис. 2). Так, штамм *I. lacteus* 2434 проявил достаточно высокую ферментативную активность культуральной жидкости уже на 5-й день культивирования – 2,93 Ед/мг, достигая максимальных значений на 15-е сутки – 12,01 Ед/мг. При дальнейшем

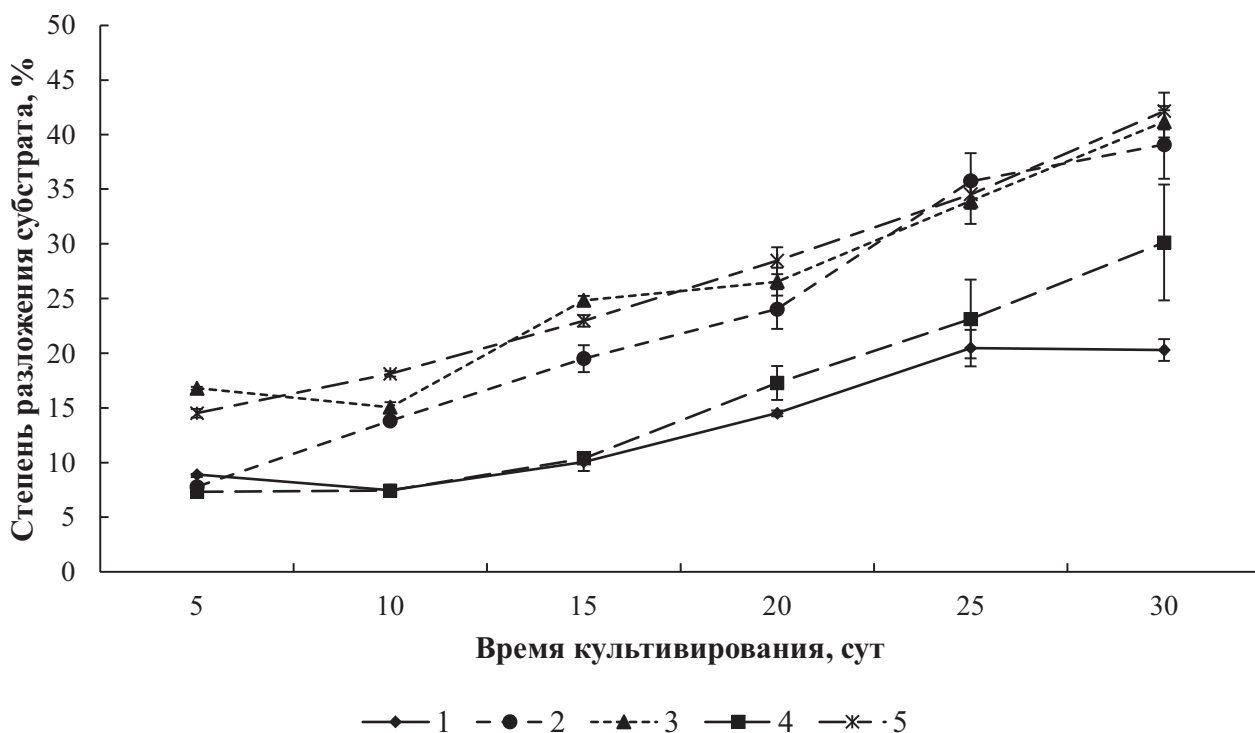


Рис. 1. Степень биодegradации пшеничной соломы при твердофазном культивировании штаммов *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

Fig. 1. The degree of biodegradation of wheat straw during solid-state fermentation of *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. strains: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

При дальнейшем культивировании штаммов *I. lacteus* 1080 и 1632 степень биодegradации пшеничной соломы незначительно повышалась до 10 % к 15-м суткам. Среди исследованных штаммов степень разложения лигноцеллюлозного субстрата штаммом 1080 была минимальна и составляла ~20 % на 30-е сутки культивирования. Для штамма *I. lacteus* 1632 потери массы субстрата к 30-м суткам культивирования составили 30 %.

К 30-м суткам культивирования степень разложения субстрата штаммами *I. lacteus* 1082, 1631 и 2434 составила 39,1–42,2 %. При твердофазном культивировании процессы разложения пшенич-

ного культивирования данного штамма ферментативная активность снижалась в 2 раза.

При твердофазном культивировании штаммов *I. lacteus* 1080 и 1082 формирование комплекса целлюлаз осуществлялось более длительно, чем при жидкофазном [15]. Целлюлозолитическая активность культуральной жидкости относительно фильтровальной бумаги в течение 20-ти суток не превышала значения 1,97 Ед/мг. На 25-е сутки культивирования целлюлозолитическая активность штаммов *I. lacteus* 1080 и 1082 возрастала до значений 3,98 Ед/мг.

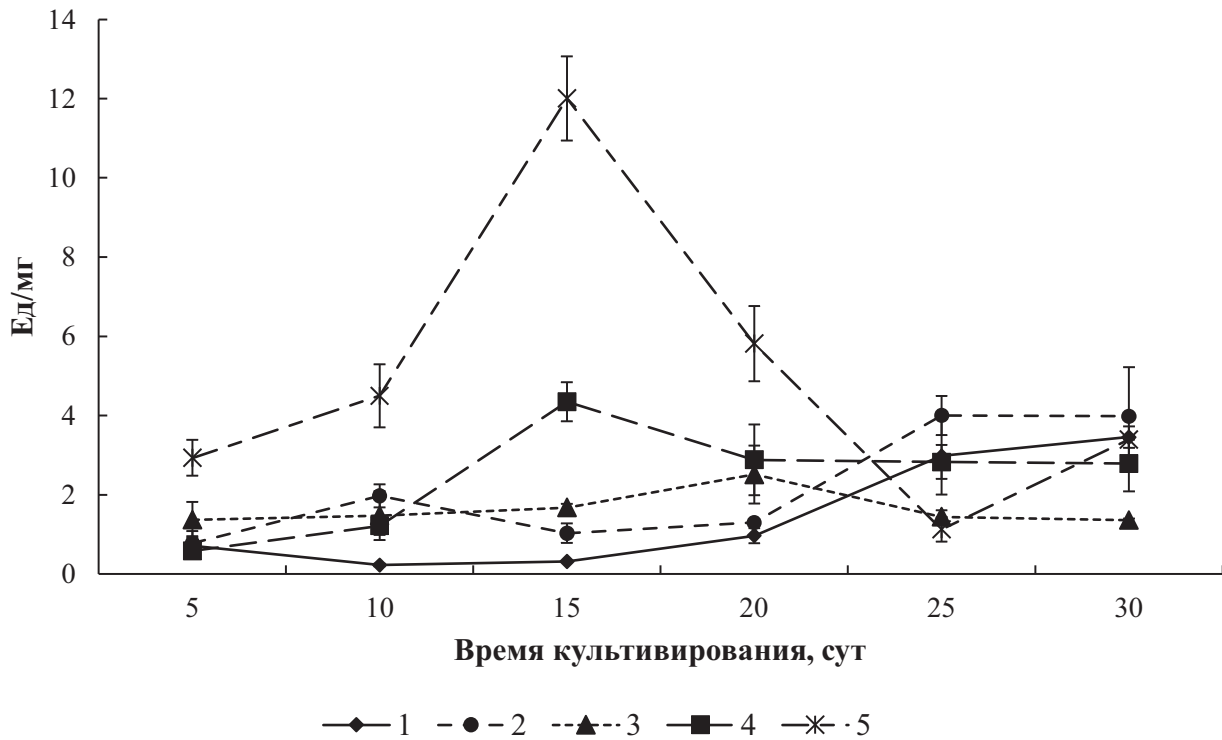


Рис. 2. Удельная целлюлозолитическая активность относительно фильтровальной бумаги при твердофазном культивировании штаммов *Irpex lacteus*: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

Fig. 2. Specific cellulolytic activity relative to filter paper during solid-state fermentation of *Irpex lacteus* strains: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

Целлюлозолитическая активность относительно фильтровальной бумаги штамма *I. lacteus* 1631 в течение всего периода твердофазного культивирования находилась на одном уровне. Для штамма *I. lacteus* 1632 максимальные значения активности отмечены на 15-е сутки культивирования и составляли 4,35 Ед/мг.

При твердофазном культивировании штаммов *I. lacteus* целлюлазы культуральной жидкости были способны к расщеплению производной целлюлозы – Na-карбоксиметилцеллюлозы (рис. 3). Характер изменения эндоглюканазной активности штаммов был разный. Для штамма *I. lacteus* 1080 максимальные значения ферментативной активности отмечены на 5-е сутки культивирования и составляли 361,54 Ед/мг, постепенно снижаясь к 30-м суткам культивирования до значений 44,13 Ед/мг.

Для штамма *I. lacteus* 1082 максимальные значения эндоглюканазной активности наблюдались на 20-е сутки культивирования и составляли 405,63 Ед/мл. Именно в этот период целлюлозолитическая активность относительно фильтровальной бумаги была низкой (рис. 2).

Активность эндоглюканазы штамма *I. lacteus* 1631 оставалась на одном уровне весь период твердофазного культивирования.

Максимальные значения целлюлозолитической активности относительно Na-карбоксиметилцеллюлозы штамма *I. lacteus* 1632 отмечены на 15-е сутки. Именно в это период установлен также максимум целлюлозолитической активности относительно фильтровальной бумаги. Очевидно, к 15-м суткам культивирования происходит активное освоение субстрата – пшеничной соломы штаммом и продолжается процесс формирования комплекса целлюлаз.

Начиная с 10-х суток твердофазного культивирования штамма *I. lacteus* 2434 наблюдалась эндоглюканазная активность. Значительное повышение активности фермента отмечено на 20-е сутки культивирования. Максимальные значения активности – 648,56 Ед/мг установлены на 30-е сутки культивирования.

На рисунке 4 представлены данные о содержании редуцирующих сахаров в культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* при твердофазном культивировании.

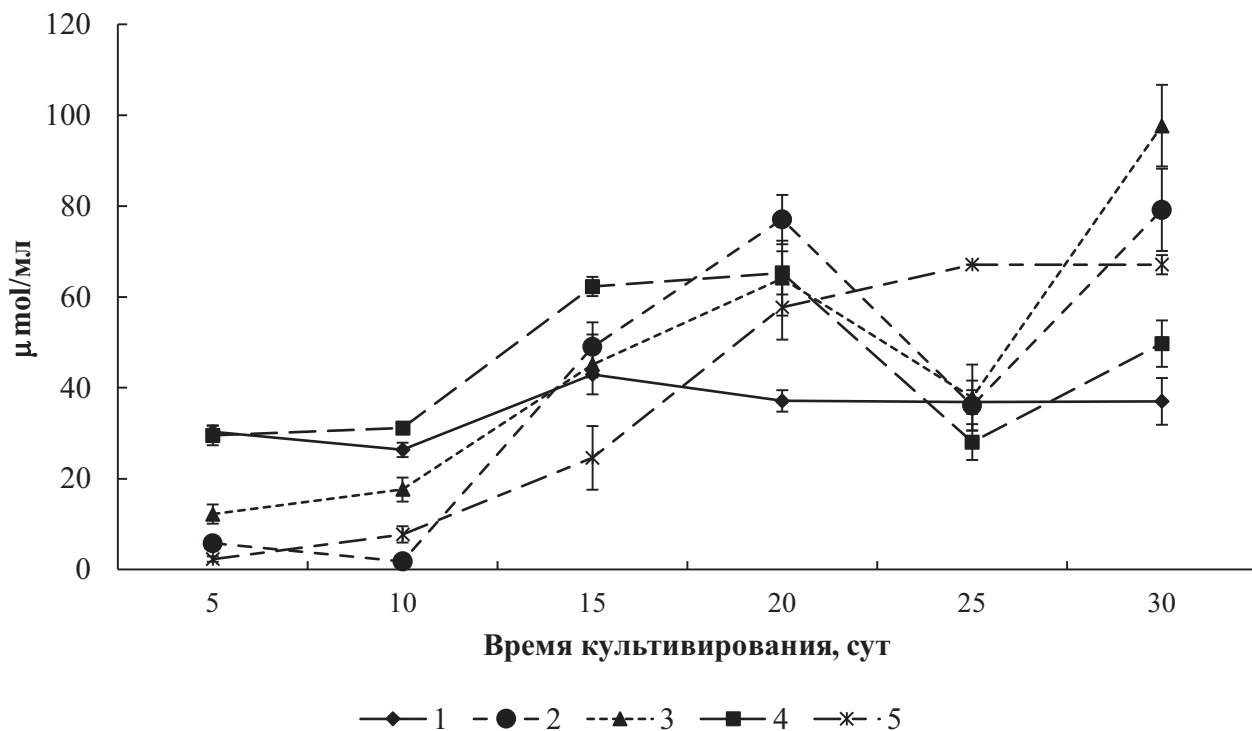


Рис. 3. Удельная целлюлозолитическая активность относительно Na-карбоксиметилцеллюлозы при твердофазном культивировании штаммов *Irpex lacteus*: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

Fig. 3. Specific cellulolytic activity relative to Na-carboxymethylcellulose during solid-state fermentation of *Irpex lacteus* strains: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

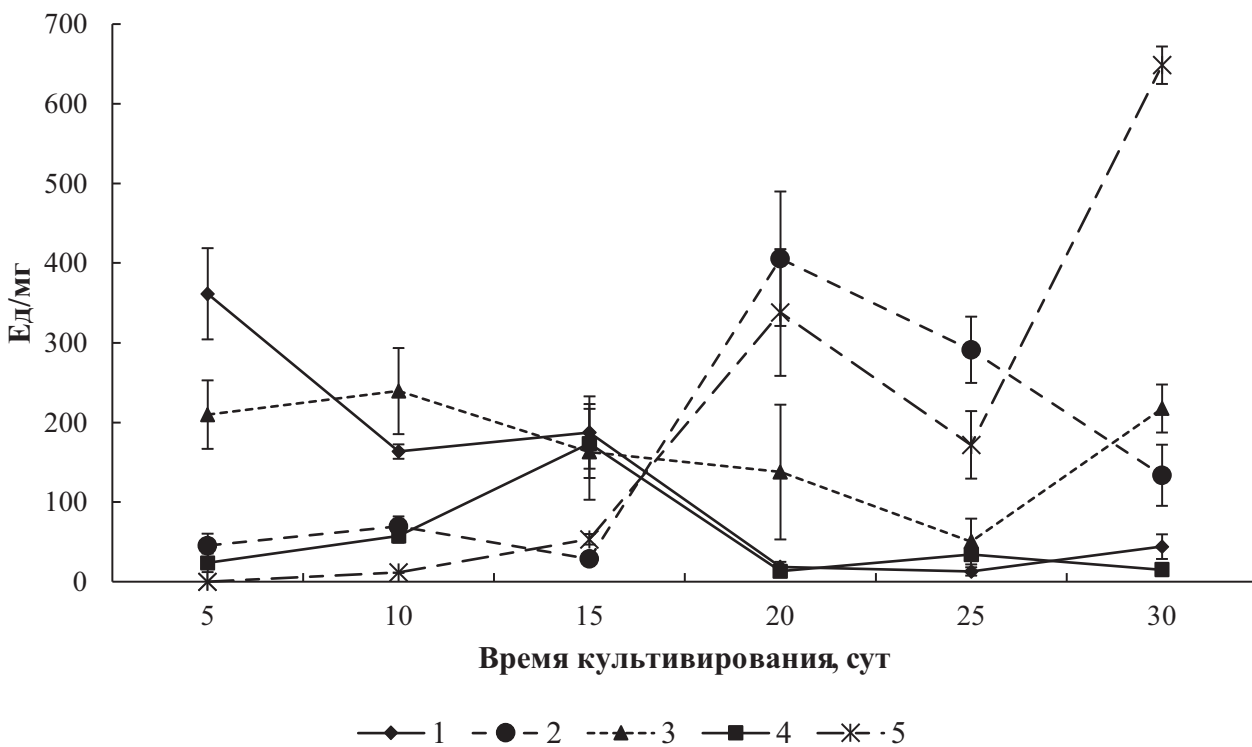


Рис. 4. Содержание редуцирующих сахаров в культуральной жидкости при твердофазном культивировании штаммов *Irpex lacteus*: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

Fig. 4. The content of reducing sugars in the culture liquid during solid-state fermentation of *Irpex lacteus* strains: 1 – 1080, 2 – 1082, 3 – 1631, 4 – 1632, 5 – 2434

Установлено, что содержание редуцирующих сахаров в культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* при твердофазном культивировании значительно выше, чем при жидкофазном [15]. Для штамма *I. lacteus* 1080 содержание редуцирующих сахаров постепенно увеличивалось к 15-м суткам культивирования и оставалось на уровне ~40 моль/мл до 30-х суток.

Для штаммов *I. lacteus* 1082, 1631, 1632 и 2434 содержание редуцирующих сахаров в культуральной жидкости постепенно увеличивалось к 30-м суткам. При этом для штаммов *I. lacteus* 1082, 1631 и 1632 отмечено снижение содержания редуцирующих сахаров на 25-е сутки культивирования, что может быть связано с их активным потреблением для роста мицелия.

Таким образом, процесс формирования целлюлазного комплекса ферментов при твердофазном культивировании на пшеничной соломе штаммов дереворазрушающего базидиомицета *I. lacteus* достаточно длительный. Очевидно, что низкая ферментативная активность целлюлаз и эндоглюканаз на начальных этапах культивирования штаммов связана с более продолжительным процессом колонизации субстрата и усвоения питательных веществ из него.

Выводы

При твердофазном культивировании на лигноцеллюлозном субстрате – пшеничной соломе штаммы *I. lacteus* синтезируют внеклеточные целлюлозолитические ферменты, гидролизующие фильтровальную бумагу и производное целлюлозы – натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы. Для штаммов *I. lacteus* отмечены высокие значения целлюлозолитической активности на фоне низкой эндоглюканазной активности культуральной жидкости. Максимальной целлюлозолитической (12,01 Ед/мг) и эндоглюканазной (648,56 Ед/мг) активностью характеризовался штамм *I. lacteus* 2434. Высокие значения целлюлозолитической активности (3,46–4,35 Ед/мг) отмечены для штаммов *I. lacteus* 1080, 1082 и 1632, низкие (2,51 Ед/мг) – для штамма *I. lacteus* 1631. Высокой активностью эндоглюканазы характеризуются штаммы *I. lacteus* 1080 и 1082 (361,54 Ед/мг и 405,63 Ед/мг соответственно). Для штаммов *I. lacteus* 1631 и 1632 отмечены более низкие значения ферментативной активности (239,48 Ед/мг и 173,70 Ед/мг соответственно).

При твердофазном культивировании все исследуемые штаммы *I. lacteus* способны колонизировать лигноцеллюлозный субстрат – пшеничную солому и разрушать его с различной скоростью. Наибольшая степень разложения субстрата отмечена для штаммов *I. lacteus* 1082, 1631 и 2434 и составляла 39,2–42,2 %, наименьшая – для штамма *I. lacteus* 1080 – 20,3 %.

С учетом показателей степени разложения ростового субстрата – пшеничной соломы, количественного определения ферментативной активности штаммы *I. lacteus* являются потенциальными продуцентами энзимов целлюлозолитического действия.

1. Берестецкий А.О., Далинова А.А., Волосатова Н.С. Метаболические профили и биологическая активность экстрактов из культуры гриба *Alternaria sonchi* S-102 при различных способах его культивирования // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55, N 3. С. 271–281.
2. Бойко С.М., Рязанова М.Є. Залежність активності целлюлозолітичних ензимів моно- та дикаріотичних культур *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray (Basidiomycetes) від субстрату // Biotechnology acta. 2013. Vol. 6, N 3. С. 116–120.
3. Древаль К.Г., Бойко М.І. Нові продуценти целлюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. 2011. Т. 4, N 1. С. 87–92.
4. Избранова С.И. Интенсификация процесса твердофазной ферментации при выращивании гриба *Pleurotus ostreatus* на растительных субстратах: автореф. дис. ... канд. техн. наук. Казань, 2001. 20 с.
5. Киселева О.В., Миронов П.В., Литовка Ю.А., Терентий С.В. Глубинное культивирование серно-желтого трутовика с целью получения белковой биомассы // Химия растительного сырья. 2011. N 4. С. 337–338.
6. Кожемякина Н.В., Ананьева Е.П., Гурина С.В., Галынкин В.А. Условия культивирования, состав и биологическая активность мицелия *Flammulina velutipes* (Fr.) P. Karst // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, N 5. С. 583–586.
7. Куликова Н.А., Кляйн О.И., Степанова Е.В., Королёва О.В. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилиза-

- ции техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 6. С. 619–634.
8. Литовка Ю.А., Павлов И.Н., Маколова П.В., Тимофеев А.А., Литвинова Е.А., Васильева А.А., Шабанов А.В. Биотехнологический потенциал сибирских штаммов базидиальных грибов – продуцентов ферментов лигноцеллюлазного действия // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 371–383.
 9. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: навчальний посібник. Донецьк: Кассиопея, 1999. 210 с.
 10. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: учебное пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
 11. 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.
 12. Соболева С.В., Литовка Ю.А. Переработка послеэкстракционного остатка коры осины с получением кормовых продуктов // Химия растительного сырья. 2011. №2. С. 83–86.
 13. Степанова Е.В., Королева О.В., Васильченко Л.Г., Карапетян К.Н., Ланъесман Е.О., Явметдинов И.С., Козлов Ю.П., Рабинович М.Л. Разложение овсяной соломы грибами при жидкофазном и твердофазном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39, № 1. С. 74–84.
 14. Туан Ле Ань, Банницына Т.Е., Канарский А.В., Качалкин А.В., Максимова И.А. Ферментативная активность и эффективность синтеза белка дрожжами *Debaryomyces hansenii* и *Guehomyces pullulans* при глубоинной твердофазной ферментации свекловичного жома // Вестник технологического университета. 2015. Т. 18, № 15. С. 243–248.
 15. Чемерис О.В. Активность целлюлозолитических ферментов *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. при культивировании на пшеничной соломе // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. 2020. №1–2. С. 99–103.
 16. Чемерис О.В. Целлюлозолитическая активность штаммов *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. при жидкофазном культивировании // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. 2020. №3–4. С. 108–113.
 17. Чемерис О.В., Рашевский В.В., Галкова К.А., Бойко М.И. Штаммовая изменчивость синтеза специфических молокосвертывающих протеиназ у базидиального гриба *Irpex lacteus* // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2016. №4. С. 45–49.
 18. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
 19. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity // Pure and Applied Chemistry. 1987. Vol. 59, № 2. P. 257–268.
 20. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars // Journal of Biological Chemistry. 1944. Vol. 153, № 2. P. 375–379.
 21. Pandey A. Solid-state fermentation // Biochemical Engineering Journal. 2003. Vol. 13. P. 81–84.
 22. Umeo S.H., Souza G.P.N., Rapachi P.M., Garcia D.M., Paccola-Meirelles L.D., Valle J.S., Colauto N.B., Linde G.A. Screening of basidiomycetes in submerged cultivation based on antioxidant activity // Genetics and Molecular Research. 2015. Vol. 14, № 3. P. 9907–9914.
 23. Wang E.-Q., Li Sh. Zh., Tao L., Geng X., Li T.-C. Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation // Applied Energy. 2010. Vol. 87. P. 2839–2845.

Поступила в редакцию: 27.01.2021

UDC 582.284:577.151.52

**CELLULOLYTIC ACTIVITY OF STRAINS OF *IRPEX LACTEUS* (FR.) FR.
DURING SOLID-STATE FERMENTATION ON WHEAT STRAW**

O.V. Chemeris

State Educational Institution of Higher Professional Education «Donetsk National University»

The paper presents results of the research of cellulolytic activity of five strains of wood-destroying basidiomycete *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., which were isolated from natural fruit bodies and stored in the Collection of cultures of the Department of Plant Physiology of Donetsk National University, and in the Collection of cultures of cap mushrooms of N.G. Kholodny Institute of Botany National Academy of Sciences of Ukraine under the numbers 1080, 1082, 1631, 1632 и 2434. During solid-state fermentation on a lignocellulosic substrate – wheat straw, the strains of *I. lacteus* showed different degrees of substrate decomposition – from 20 to 42.2 %, cellulolytic activity – from 0.23 to 12.01 U/mg and endoglucanase activity – from 15.2 to 648.56 U/mg. The most promising producers of enzymes of the cellulolytic complex are *I. lacteus* strains 1082, 1631, and 2434.

Key words: *Irpex lacteus*, cellulolytic activity, solid-state fermentation, wheat straw

Citation: Chemeris O.V. Cellulolytic activity of strains of *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. during solid-state fermentation on wheat straw // Industrial Botany. 2021. Vol. 21, N 1. P. 28–35.
