

УДК 577.151.01 : 663.15

© К. Г. Древаль, В. В. Бойко, М. І. Бойко

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ КУЛЬТИВУВАННЯ НА АМІЛОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ФІЛЬТРАТИВ ДЕЯКИХ ШТАМІВ БАЗИДИОМІЦЕТІВ

Донецький національний університет; 83050, м. Донецьк, вул. Щорса, 46
e-mail: k.dreval@gmail.com

Древаль К. Г., Бойко В. В., Бойко М. І. Вплив температури культивування на амілолітичну активність культуральних фільтратів деяких штамів базидіоміцетів. – Вивчено активність α - та β -амілаз культуральних фільтратів різних штамів вищих сапротрофних дереворуйнівних грибів, що культивувались за різних температур. За всіх досліджуваних температур культивування амілази з'являються в культуральній рідині базидіоміцетів вже до 3 доби ферментації. Для більшості штамів найбільш оптимальним терміном культивування для отримання максимальної активності амілаз є 7–9 діб. Температура проведення ферментації істотно впливає на синтез та активність екзоензимів амілолітичної дії базидіоміцетів. Оптимальна температура для синтезу α -амілаз не співпадає з оптимальною температурою продукції β -амілаз базидіоміцетами. Для отримання культуральних фільтратів штамів *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 та *Trametes versicolor* 4 з найвищою активністю α -амілаз культивування слід проводити за температури 30°C, базидіоміцетів *Irpex lacteus* K-1, А-Дон-02, Д-1 та *Trametes hirsutum* 3 – за температури 32°C, а культури *Trichaptum biforme* T.bif – за температури 34°C. З метою одержання екзоензимів β -амілазної дії штамів *Irpex lacteus* А-Дон-02 та *Trametes hirsutum* 3 ферментацію потрібно проводити за температури 30°C, культур *Irpex lacteus* K-1, Д-1 – за температури 32°C, а штамів *Trichaptum biforme* T.bif, *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 та *Trametes versicolor* 4 – за температури 34°C.

Ключові слова: α -амілаза, β -амілаза, базидіоміцети, температура, динаміка.

Древаль К. Г., Бойко В. В., Бойко М. І. Влияние температуры культивирования на амилолитическую активность культуральных фильтратов некоторых базидиомицетов. – Изучены активность α - и β -амилаз культуральных фильтратов различных штаммов высших сапротрофных дереворазрушающих грибов, которые культивировались при различных температурах. При всех исследуемых температурах культивирования амилазы появляются в культуральной жидкости базидиомицетов уже на 3-и сутки ферментации. Для большинства штаммов наиболее оптимальным сроком культивирования для получения максимальной активности амилаз является 7–9 суток. Температура проведения ферментации существенно влияет на синтез и активность экзоферментов амилолитического действия базидиомицетов. Оптимальная температура для синтеза α -амилаз не совпадает с оптимальной температурой продукции β -амилаз базидиомицетами. Для получения культуральных фильтратов штаммов *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 и *Trametes versicolor* 4 с наивысшей активностью α -амилаз культивирование следует проводить при температуре 30°C, базидиомицетов *Irpex lacteus* K-1, А-Дон-02, Д-1 и *Trametes hirsutum* 3 – при температуре 32°C, а культуры *Trichaptum biforme* T.bif – при температуре 34°C. С целью получения экзоферментов β -амилазного действия штаммов *Irpex lacteus* А-Дон-02 и *Trametes hirsutum* 3 ферментацию следует проводить при температуре 30°C, культур *Irpex lacteus* K-1, Д-1 – при температуре 32°C, а штаммов *Trichaptum biforme* T.bif, *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 и *Trametes versicolor* 4 – при температуре 34°C.

Ключевые слова: α -амилаза, β -амилаза, базидиомицеты, температура, динамика.

Амілази мають важливе промислове значення серед ферментів, що гідролізують крохмаль [2]. Дослідження амілолітичних ензимів зумовлене широкими перспективами щодо їх використання у медицині, харчовій і легкій промисловості як ефективних та безпечних біокатализаторів [7]. Амілолітичні ферменти широко використовують в промислових процесах переробки крохмалю: у виробництві глюкозних сиропів і етилового спирту [11], в хлібопекарстві, у виробництві паперу [4]. В останні роки α -амілазу почали широко використовувати в медичній і клінічній хімії [3], що в свою чергу потребує ензимів з високою активністю. Віднедавна амілази почали використовувати як компоненти екологічно безпечних мийних засобів [9]. Глюкоамілази та амілази, які є ключовими ензимами при біоконверсії гідролізаторів крохмалю, належать до препаратів, які інтенсивно використовують у світі – виробництво їх становить декілька тисяч тонн на рік [11]. У наш час проводиться активний пошук продуцентів амілолітичних ферментів і їх дослідження, а також роботи над удосконаленням існуючих штамів. Саме тому пошук і дослідження нових штамів – продуцентів амілаз актуальне як з практичної, так і теоретичної точок зору.

Метою роботи було вивчення впливу температури культивування на амілолітичну активність базидіоміцетів.

Матеріал і методи дослідження

В якості об'єктів дослідження обрано 7 штамів вищих базидіальних грибів: К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schrot., 3 *Trametes hirsutum* (Wulfen) Pilat., 4 *Trametes versicolor* (L.) Pilat, T.bif. *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvardeen. Плодові тіла грибів зібрано з деревних рослин, що зростали на території м. Донецька та Донецької області. Виділення чистих культур проводили відповідно до загальноприйнятих методик [6, 9].

Для дослідження амілолітичної активності штами культивували на рідкому середовищі Чапека такого складу (г/л) [6]: 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. На основі попередніх досліджень в якості єдиного джерела вуглецю до живильного середовища вносили крохмаль у кількості 4 г/л. рН живильного середовища доводили до 5 од. за допомогою 10% розчину HCl або NaOH на аналізаторі іонів AI-123 (Україна). Культивування проводили за оптимальних температур росту штамів: 30, 32 та 34°C.

При обчисленні результатів за одиницю активності приймали таку кількість ферменту, яка утворювала 1 мкмоль редуруючих цукрів протягом 1 хв. в умовах досліду. Редууючі цукри визначали за методом Шомодь–Нельсона [14]. Калібрувальну криву будували за мальтозою.

Всі дослідження проводили у трикратній повторності. Отримані дані статистично обробляли методами дисперсійного аналізу, порівняння середніх арифметичних величин здійснювали за методом Дункана [10].

Результати та їх обговорення

Встановлено динаміку α -амілазної активності штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus*, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa*, 3 *Trametes hirsutum*, 4 *Trametes versicolor*, T.bif. *Trichaptum biforme*, яка показана на рис 1. Для всіх культур спостерігалась певна періодичність активності амілолітичних ензимів у їх культуральних фільтратах.

Для культури К-1 *I. lacteus* α -амілазна активність різко зростала з 3 по 7 та з 9 по 12 добу культивування за температури 32°C, а за температур 30 та 34°C не досягала високих значень. Для штаму Д-1 *I. lacteus* α -амілазна активність найвища з 7 по 9 добу вирощування за температури 32°C. У культури AnSc-1 *D. confragosa* α -амілазна активність нижча за температур 34 і 32°C з 3 доби культивування, ніж за температури 30°C. У культури А-Дон-02 *I. lacteus* спостерігалось різке зростання α -амілазної активності з 3 по 7 добу ферментації та поступове її зниження з 12 по 15 добу культивування за температури 32°C. Для культур 4 *T. versicolor* та 3 *T. hirsuta* α -амілазна активність незначна порівняно із іншими штамми. Різке збільшення α -амілазної активності штаму T.bif. *T. biforme* спостерігалось з 7 по 9 добу за температур 30, 32 та 34°C і різке зниження – на 15 добу ферментації. Певну періодичність активності α -амілаз у культуральних фільтратах можна пояснити зміною концентрації ферменту та субстрату, а також процесами регуляції біосинтезу ферментів на різних етапах життєвих фаз базидіоміцетів.

Найвищу α -амілазну активність встановлено у штамів К-1 *I. lacteus* з 3 по 7 та з 9 по 12 добу культивування та А-Дон-02 *I. lacteus* з 3 по 7 добу ферментації за температури 32°C.

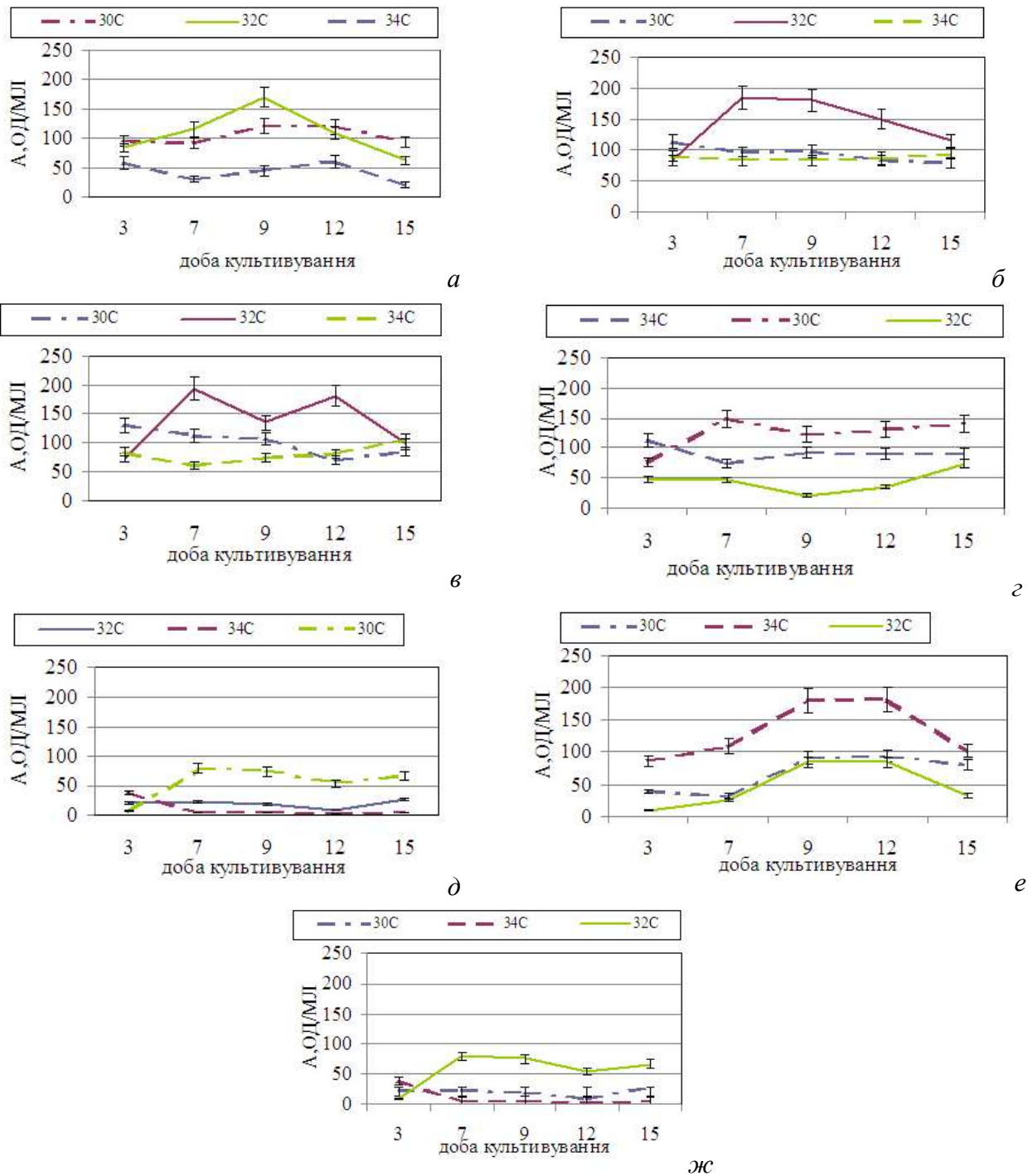


Рис. 1. Динаміка α -амілазної активності штамів *Irpex lacteus* К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в), *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 (г), *Trichaptum biforme* Т.бif (д), *Trametes versicolor* 4 (е) та *Trametes hirsutum* 3 (ж) за різних температур культивування.

Динаміку β -амілазної активності базидіальних грибів показано на рис. 2. β -амілазна активність штаму К-1 *I. lacteus* різко зростала з 3 по 7 добу культивування за температури 32°C, а з 3 по 9 добу за температури 30°C – знижувалась. Для штаму Д-1 *I. lacteus* β -амілазна активність найвища на 9 добу експерименту за температури культивування 30°C. У культури AnSc-1 *D.confragosa* β -амілазна активність зростала до 12 доби ферментації за температури 34°C, а у штаму А-Дон-02 – на 7 та 9 добу культивування за температури 30°C. Для штаму Т.бif. *T.biforme* β -амілазна активність за температур 30, 32 та 34°C незначна порівняно з іншими штамми. У культури 4 *T. versicolor* спостерігалось різке збільшення β -амілазної активності на 9 добу вирощування за температур 32 та 34°C з наступним різким зниженням

на 12 добу ферментації. Для штаму 3 *T.hirsuta* β-амілазна активність зростала з 7 по 9 добу за температур 30 та 32°C, а за температури 34°C – була незначною.

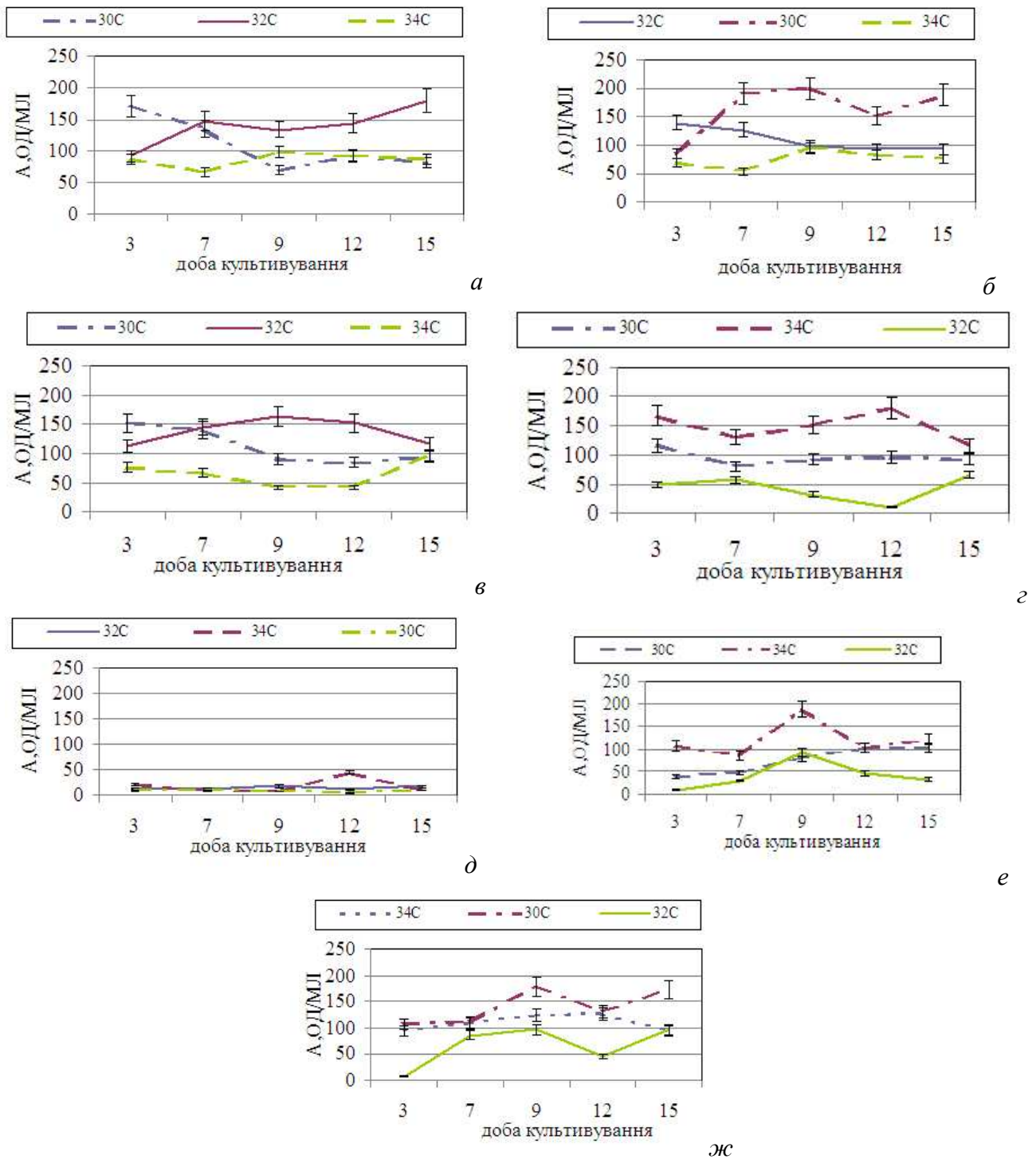


Рис. 2. Динаміка β-амілазної активності штамів *Irpex lacteus* К-1 (а), А-Дон-02 (б), Д-1 (в), *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 (г), *Trichaptum biforme* T.bif (д), *Trametes versicolor* 4 (е) та *Trametes hirsutum* 3 (ж) за різних температур культивування.

Таким чином, за всіх досліджених температур культивування амілази з'являються у культуральній рідині базидіоміцетів вже до 3 доби ферментації. Для більшості штамів найбільш оптимальним терміном культивування для отримання максимальної активності амілаз є 7–9 діб. Температура проведення ферментації істотно впливає на синтез та активність екзоензимів амілолітичної дії базидіоміцетів. Оптимальна температура для синтезу α-амілаз не співпадає з оптимальною температурою продукції β-амілаз

базидіоміцетами. Для отримання культуральних фільтратів штамів *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 та *Trametes versicolor* 4 з найвищою активністю α -амілаз культивування слід проводити за температури 30°C, базидіоміцетів *Irpex lacteus* К-1, А-Дон-02, Д-1 та *Trametes hirsutum* 3 – за температури 32°C, а культури *Trichaptum biforme* Т.бif – за температури 34°C. З метою одержання екзоензимів β -амілазної дії штамів *Irpex lacteus* А-Дон-02 та *Trametes hirsutum* 3 ферментацію потрібно проводити за температури 30°C, культур *Irpex lacteus* К-1, Д-1 – за температури 32°C, а штамів *Trichaptum biforme* Т.бif, *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 та *Trametes versicolor* 4 – за температури 34°C.

Список літератури

1. Арефьев С. П. Системный анализ биоты дереворазрушающих грибов: монография / С. П. Арефьев. – Новосибирск: Наука, 2010. – 257 с.
2. Амилитические ферменты гриба *Aspergillus niger*: выделение и свойства / Н. Ю. Шарова, Т. А. Никифорова, В. П. Комов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2006. – № 3. – С. 42–44.
3. Белова Н. В. Современные направления экспериментального исследования базидиомицетов / Н. В. Белова // Микология и фитопатология. – 1997. – Т. 31, № 6. – С. 345–348.
4. Белова Н. В. Виды базидиомицетов и их использование в отечественной промышленной биотехнологии / Н. В. Белова, А. В. Обрезкова, И. И. Шамолина // Вестник Санкт-Петербургского гос. ун-та технологии и дизайна. – 2011. – № 1. – С. 27–32.
5. Билай В. И. Основы общей микологии / В. И. Билай. – К.: Наук. думка, 1973. – 243 с.
6. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии / В. И. Билай. – К.: Наук. думка, 1973. – 243 с.
7. Древаль К. Г. Динаміка синтезу целлюлоз вищими дереворуйнівними базидіальними грибами / К. Г. Древаль, К. В. Кузнецова, А. В. Юдіна, М. І. Бойко // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – № 4. – С. 52–59.
8. Мишарина Т. А. Влияние состава полисахаридов в желатинизированном кукурузном крахмале на связывание спиртов / Т. А. Мишарина, А. Л. Самусенко, М. А. Калинин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 703–707.
9. Перт С. Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток: пер. с англ. / С. Д. Перт. – М: Мир, 1978. – 331с.
10. Приседский Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю. Г. Приседский. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.
11. Стручкова И. В. Амилазная и оксидоредуктазная активность миксодекструктора *Aspergillus terreus* при его росте на полимерных материалах / И. В. Стручкова, Е. С. Лазарева, В. Ф. Смирнов // Вестник Нижегородского ун-та им. Н. И. Лобачевского. – 2010. – № 2 (2). – С. 591–595.
12. Соловьев В. А. Дереворазрушающая способность грибов: меры определения, эскизные модели и параметры / В. А. Соловьев, О. Н. Малышева // Грибные сообщества лесных экосистем. – Петрозаводск, 2004. – Т. 2. – С. 197–220.
13. Травень В. Ф. Сравнительный анализ продуктов гидроксиэтилирования картофельного и кукурузного крахмалов // Химия растительного сырья. – 2009. – Т. 1, № 3. – С. 57–61.
14. Nelson N. A photometric adaptation of the Shomogyi method for the determination of sugars / N. Nelson // J. Biol. Chem. – 1944. – Vol. 153, N 2. – P. 375–379.

Надійшла до редакції 17.11.2013

Прийнята до друку 23.12.2013

Dreval K. G., Boyko V. V., Boyko M. I.
**INFLUENCE OF CULTIVATION TEMPERATURE ON AMYLOLYTIC ACTIVITY OF SOME
BASIDIOMYCETE STRAINS**

Donetsk National University; Schorsa Str., 46, Donetsk, 83050, Ukraine; e-mail: k.dreval@gmail.com

Amylases are of great industrial importance among enzymes that hydrolyze starch. Researching of amylolytic enzymes caused because of wide prospects for their use in medicine, food and light industries as a safe and effective biocatalysts. Nowadays producers of amylolytic enzymes are under active searching and it defines their research and work on improving of existing strains. That is why the search and investigation of new strains – producers of amylases is relevant both from practical and theoretical points of view. The aim of this study was to investigate the effect of temperature on amylase activity of basidiomycete culture liquids.

In this research α - and β -amylase activity of cultural filtrates of different strains of higher saprotrophic wood-destroying fungi, cultivated at different temperatures, were studied. The research were carried out on seven strains of higher basidiomycetes: K-1, A-ДОН-02, Д-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schrot. 3 *Trametes hirsutum* (Wulfen) Pilat., 4 *Trametes versicolor* (L.) Pilat, T.bif. *Trichaptum bifforme* (Fr.) Ryvardeen. Cultivation was carried out under temperatures close to the optimal growth temperatures of strains: 30, 32 and 34°C. Per unit of amylase activity were took the amount of enzyme that formed 1 micromole of reducing sugars (as maltose) in 1 min under the conditions of experiment ($t = 40^\circ\text{C}$).

Amylases appeared in the culture liquid of basidiomycetes by the 3rd day of fermentation under all investigated cultivation temperatures. The optimal cultivation period of most strains for obtaining maximum amylase activity is 7-9 days. Fermentation temperature significantly affects the synthesis and activity of amylase exoenzymes of basidiomycetes. The optimum temperature for the synthesis of α - amylase does not coincide with the optimum temperature of β -amylase production by basidiomycetes. For strains *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 and *Trametes versicolor* 4 the highest activity of α -amylase observed under the cultivation temperature 30°C, for basidiomycetes *Irpex lacteus* K-1, A-ДОН-02, Д-1 and *Trametes hirsutum* 3 – under the temperature 32°C, and for the culture *Trichaptum bifforme* T.bif – under the temperature 34°C. To obtain exoenzymes with β -amylase action strains *Irpex lacteus* A-ДОН-02 and *Trametes hirsutum* 3 should be cultivated at the temperature 30°C, cultures *Irpex lacteus* K-1, Д-1 – at the temperature 32°C and strains *Trichaptum bifforme* T.bif, *Daedaleopsis confragosa* AnSc-1 and *Trametes versicolor* 4 – at the temperature 34°C.

Key words: α -amylase, β -amylase, basidiomycetes, temperature, dynamics.

References

1. Arefeva, S.P. (2010). Systems analysis of wood-mushrooms. Novosibirsk, 257 p.
2. Scharova, N.Y., Nikiforov, T.A., & Komov, P.V. (2006). Amylolytic enzymes of the fungus *Aspergillus niger*: separation and properties. Storage and processing of farm products, 3, 42-44.
3. Belov, N.V. (1997). Modern experimental studies of basidiomycetes. Mikology and phytopathology, 31, 6, 345-348.
4. Belov, N.V., Obrezkova, A.V., & Shamolyna, I.I. (2011). Types of basidiomycetes and their using in biotechnology. Bulletin of Saint-Petersburg Technology and Design State University, 1, 27-32.
5. Bilai, V.I. (1973). Fundamentals of mycology. Kyiv, 243 p.
6. Bilai, V.I. (1982). Methods of experimental mycology. Kyiv, 552 p.
7. Dreval, K.V., Kuznetsova, K.V., Yudina, A.V., & Boyko, M.I. (2011). Dynamics of cellulase synthesis by higher wood-degrading Basidiomycetes. Microbiology and Biotechnology, 4(16), 52-60.
8. Mysharyna, T.A., Samusenko, A.L., & Kalynchenko, M.A. (2003). Effect of polysaccharides composition in gelled corn starch on alcohols binding. Applied biochemistry and microbiology, 39, 6, 703-707.
9. Perth, S.D. (1978). Fundamentals of microorganisms and cells cultivation. Moscow, 331 p.
10. Prysedsky, Yu.G. (1999). Statistical analysis of the results of biological experiments. Donetsk, 210 p.
11. Stryuchkova, I.V., Lazarev, E.S., & Smirnov, V.F. (2010). Amylolytic and oxidoreductase activity of myksodestroyer *Aspergillus terreus* grown on polymer materials. Journal of N.I. Lobachevskoho Nyzhehorodsky University, 2(2), 591-595.
12. Soloviev, V.A., & Malysheva, O.N. (2004). Mushrooms wood-degrading ability: determining ways, scetch-models and parameters. Fungal communities of forests ecosystems, Petrozavodsk, 2, 197-220.
13. Traven, V.F. (2009). Comparative analysis of hydroxyetylating products of potato and corn starches. Chemistry of plant raw material, 1, 3, 57-61.
14. Nelson N. (1944). A photometric adaptation of the Shomogyi method for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry, 153, 2, 375-379.

Received: 17.11.2013

Accepted: 23.12.2013