

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ЕНДО-1,4- β -ГЛЮКАНАЗИ У ШТАМУ ДЕРЕВОРУЙНУЮЧОГО БАЗИДИОМІЦЕТУ *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE*

Гузенко Ю.О., Ліновицька В.М.
КПІ ім. Ігоря Сікорського, linovytska.vita@iik.kpi.ua

Abstract

This article is devoted to the study of the cellulolytic activity of the enzyme endo-1-4- β -glucanase in a strain of wood-destroying basidiomycete Schizophyllum commune. It was established that the maximum value of endo-1,4-beta-glucanase activity in the S. commune 1770 strain was 0.213 ± 0.012 IU/cm³ on a synthetic medium with carboxymethylcellulose (6 days of cultivation).

Keywords: *basidiomycete, Schizophyllum commune, cellulolytic activity, endo-1-4- β -glucanase, submerged cultivation, biodegradation.*

Вступ. Значну частку вуглецевих відходів на планеті складає лігноцелюлоза, тим самим забруднюючи навколишнє середовище. Целюлоза, як лінійний гомополімер, входить до складу лігноцелюлози та є найпоширенішим компонентом рослинної біомаси. Актуальним завданням є пошук ефективних технологій деструкції даного гомополімеру [1, 2].

Целюлази дозволяють ефективно біоконвертувати відходи шляхом ферментної біодеградації, мінімально впливаючи на навколишнє середовище.

До целюлаз входить три основні групи ферментів, зокрема ендоглюканази (ендо-1,4- β -глюканаза, ЕС 3.2.1.4), екзоглюканази (екзо-1,4- β -D-глюкан-4-целобіогідролаза, ЕС 3.2.1.91) та β -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21). Ендоглюканази мають властивість хаотично атакувати у структурі целюлози 1,4- β -глікозидні зв'язки. Таким чином у результаті розщеплення формуються різні за довжиною глюканові ланцюги. Екзоглюканази здійснюють гідроліз переважно на кінцях целюлозного ланцюга, у результаті чого вивільняють целобіозу або глюкозу. Діють як на редукуючі, так і нередукуючі кінці целюлозного ланцюга. β -глюкозидаза завершає процес розкладання целюлози, вивільняючи молекули глюкози з целобіози або целодекстрину [3, 4].

Фермент ендо-1,4- β -глюканаза грає ключову роль в індукуванні процесу розкладу целюлози. Випадкова дія даного ферменту пояснюється топологією активного центру, яка має подібність до розщелини, що дозволяє рандомізовано діяти на β -1,4-глікозидні зв'язки вздовж целюлозного ланцюга.

Ендоглюканази, що виробляються грибами, зазвичай являють собою мономери з дуже низьким або відсутнім рівнем глікозилування. Біосинтез ендо-1,4- β -глюканази відбувається у секреторах приблизно на рівні 20 % маси [5].

Ефективним продуцентом целюлаз вважається дереворуйнівний гриб *Schizophyllum commune*, що має ефективну целюлолітичну ферменту систему. Даний базидіоміцет у своєму геномі налічує близько 240 генів-кандидатів для гліко-гідролаз, що робить цей вид потенційно ефективним для біоконверсії рослинних відходів сільського господарства та деревопереробної промисловості [6-10].

Метою даної роботи було дослідження активності ендо-1,4- β -глюканази у штаму дереворуйнуючого базидіоміцету *Schizophyllum commune*.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження був штам 1770 *Schizophyllum commune*, виділений авторами з плодових тіл, зібраних на тополі, на території Києва і переданий до Колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України ІБК.

Активність ендо-1,4- β -глюканази вивчали на рідкому синтетичному середовищі наступного складу (г/дм³): NH₄NO₃ – 3; MgSO₄·3H₂O – 0,5; глюкоза – 30, до якого додавали карбоксиметилцелюлозу – 10. Глибинне культивування проводили на орбітальному шейкері (180 об/хв), в колбах Ерленмеєра на 250 мл, за температури 30 °С, протягом 5-7 діб.

Активність ферменту ендо-1,4- β -глюканази (ЕС 3.2.1.4 ендо-1,4- β -D-глюканглюкогідролаза) визначали за рівнем утворення глюкози в інкубованій суміші з 0,3% карбоксиметилцелюлози (КМЦ-активність). Склад реакційних сумішей при визначенні ферментативної активності та умови проведення реакцій відповідали рекомендаціям IUPAC [11]. Кількість глюкози, що утворювалась у результаті дії ферменту, визначали фотометрично феріціанідним методом [12]. За одиницю ферментативної активності (IU) приймали утворення 1 мкмоль редуруючих цукрів протягом 1 хв за температури 40 °С при додаванні 1 мл культурального фільтрату. (IU/см³, мкмоль/(хв×см³)).

Результати та обговорення. В результаті проведеного глибинного культивування було визначено ендоглюканазну активність штаму 1770 *S. commune*.

Встановлено, що максимальне значення активності ендо-1,4- β -глюканази у штаму *S. commune* 1770 склало 0,213±0,012 IU/см³ на синтетичному середовищі з карбоксиметилцелюлозою (6 доба культивування).

Отримані данні показали схожий з попередньо дослідженими авторами штамми *S. commune* рівень активності ендо-1,4- β -глюканази [13]. А саме, штам *S. commune* 1764 на синтетичному середовищі з карбоксиметилцелюлозою так само на 6 добу культивування продемонстрував активність ендо-1,4- β -глюканази на рівні 0,177±0,013 IU/см³ [13]. Порівнюючи активність ферменту ендо-1,4- β -глюканази зі штамом у попередньому дослідженні, можна сказати, що *S. commune* 1770 вирізняється збільшеною ферментативною активністю приблизно на 0,035-0,037 IU/см³.

Висновки. Було визначено активність целюлолітичного ферменту ендо-1,4- β -глюканази базидієвого гриба *S. commune* 1770 на синтетичному середовищі з карбоксиметилцелюлозою, що становить 0,213±0,012 IU/см³.

Список використаної літератури:

1. Чабанюк Я. В., Бровко І. С., Мельнікова І. О., Спатару К. В. Пошук активних продуцентів ендо-1,4- β -глюканази для біодеструкції рослинних решток. Сільськогосподарська мікробіологія. 2021. Вип. 34. С. 15–22.
2. Бойко С.М. Целюлази базидієвих грибів для розробки технологій біоконверсії клітковини. Український ботанічний журнал, 2020. 77(5): 378–385.

3. Soumya Chatterjee, Sonika Sharma, Rajesh Kumar Prasad, Sibnarayan Datta, Dharmendra Dubey, Mukesh K Meghvansi, Mohan G Vairale, Vijay Veer. Cellulase Enzyme based Biodegradation of Cellulosic Materials: An Overview. South Asian Journal of Experimental Biology. 2016. Vol. 5, no. 6. P. 271–282. URL: [https://doi.org/10.38150/sajeb.5\(6\).p271-282](https://doi.org/10.38150/sajeb.5(6).p271-282)
4. Kuhad R. C., Gupta R., Singh A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*. 2011. Vol. 2011. P. 1–10. URL: <https://doi.org/10.4061/2011/280696>
5. Annamalai N., Rajeswari M. V., Balasubramanian T. Endo-1,4- β -glucanases: Role, Applications and Recent Developments. *Biofuel and Biorefinery Technologies*. Cham, 2016. P. 37–45. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-43679-1_3
6. Ning Zhu, Jiawen Liu, Jinshui Yang, Yujian Lin, Yi Yang, Lei Ji, Meng Li & Hongli Yuan. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*. 2016. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0461-x>
7. Bikash Kumar, Nisha Bhardwaj, Ansar Alam, Komal Agrawal, Himanshu Prasad & Pradeep Verma. Production, purification and characterization of an acid/alkali and thermo tolerant cellulase from *Schizophyllum commune* NAIMCC-F-03379 and its application in hydrolysis of lignocellulosic wastes. *AMB Express*. 2018. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0696-y>
8. Young Min Lee, Hanbyul Lee, Young Mok Heo, Hwanhwi Lee, Joo-Hyun Hong & Jae-Jin Kim. Transcriptional analysis of genes encoding β -glucosidase of *Schizophyllum commune* KUC9397 under optimal conditions. *Folia Microbiologica*. 2016. T. 62, № 3. C. 191–196. URL: <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0484-5>
9. Younho Song, Yoon Gyo Lee, In Seong Choi, Kwang Ho Lee, Eun Jin Cho, Hyeun-Jong Bae. Heterologous expression of endo-1,4- β -xylanase A from *Schizophyllum commune* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 2013. T. 52, № 3. C. 170–176. URL: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.12.012>
10. Бухало А.С., Дуган О.М., Максимюк М.Р., Ліновицька В.М. Ферментативна активність вищого базидіального гриба *Schizophyllum commune*. Вісник Національного авіаційного університету. 2012. № 3. С. 154-159.
11. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity. *Pure and Applied Chemistry*, 1987. 59(2): 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
12. Оцінка якості і безпека продукції тваринництва. Методичні вказівки для виконання лабораторно-практичних занять студентами денної та заочної форми навчання факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва та ветеринарії, спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» ОС «Бакалавр». Вінниця. ВНАУ. – 2019. – 54 с.
13. Ліновицька В. М., Гузенко Ю. О. Целюлолітична активність базидієвого дереворуйнуючого гриба *Schizophyllum commune* // *Світ наукових досліджень*. Випуск 19 : матеріали Міжнар. мультидисциплінар. наук. інтернет-конф., м. Тернопіль, м. Переворськ, 23–24 трав. 2023 р., Тернопіль, 2023. С. 211–214.