

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКОФИЛЬНОГО ГРИБА *HYROMYCES ROSELLUS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИХ СРЕДАХ

В последние годы проблема утилизации целлюлозо- и гемицеллюлозосодержащих отходов деревоперерабатывающей, сельскохозяйственной и целлюлозно-бумажной промышленности имеет широкие перспективы практического использования в связи с необходимостью защиты окружающей среды.

Способность микофильных грибов к образованию целлюлаз и гемицеллюлаз (ксиланаз) создает условия прямой микробной трансформации древесно-растительных отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности в белок и другие практически ценные органические соединения. Из имеющихся в литературе данных известно, что биосинтез гидролитических ферментов у микроскопических грибов происходит при внесении в питательную среду индукторов, а также за счет подбора оптимальных условий культивирования микромицетов.

Микофильный гриб *Hyromyces rosellus* ВКПМ F-242 известен как продуцент протеолитических ферментов и других практически ценных продуктов метаболизма. Однако в литературе отсутствуют данные по изучению способности микофильного гриба *Hyromyces rosellus* ВКПМ F-242 к биосинтезу ферментов, обеспечивающих эффективный гидролиз древесно-растительных отходов сельского хозяйства и деревоперерабатывающей промышленности. В результате наших исследований было показано, что в глубинных условиях при культивировании штамма на средах, содержащих в качестве единственного источника углерода хвойные опилки, пшеничные отруби и кукурузные стержни гриб синтезирует внеклеточную эндо-1,4- $\beta$ -D-глюканазу и ксиланазу. Наибольшая активность целлюлолитических ферментов отмечалась на среде с кукурузными стержнями, при этом количество ксиланазы составило 7,08 ед/мл; целлюлазы – 5,7 ед/мл. Определение фракционного состава культуральной жидкости показало, что большая часть внеклеточных белков являются водо- и спирторастворимыми.

**Ключевые слова:** микофильный гриб *Hyromyces rosellus*, целлюлаза, ксиланаза, водо- и спирторастворимые белки.

В последние годы проблема утилизации целлюлозо- и гемицеллюлозосодержащих отходов деревоперерабатывающей, сельскохозяйственной и целлюлозно-бумажной промышленности имеет широкие перспективы практического использования в связи с необходимостью защиты окружающей среды.

Способность микофильных грибов к образованию целлюлаз и гемицеллюлаз (ксиланаз) создает условия прямой микробной трансформации древесно-растительных отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности в белок и другие практически ценные органические соединения. Из имеющихся в литературе данных известно, что биосинтез гидролитических ферментов у микроскопических грибов происходит при внесении в питательную среду индукторов, а также за счет подбора оптимальных условий культивирования микромицетов [1].

Микофильный гриб *Hyromyces rosellus* ВКПМ F-242 известен как продуцент протеолитических ферментов и других практически ценных продуктов метаболизма. Однако в ли-

тературе отсутствуют данные по изучению способности микофильного гриба *Hyromyces rosellus* ВКПМ F-242 к биосинтезу ферментов, обеспечивающих эффективный гидролиз древесно-растительных отходов сельского хозяйства и деревоперерабатывающей промышленности.

Целью настоящей работы было изучение микофильного гриба *Hyromyces rosellus* ВКПМ F-242 как возможного продуцента целлюлаз и ксиланаз.

### Материал и методы исследований

В нашей работе использовали штамм микофильного гриба *Hyromyces rosellus* ВКПМ F-242, ранее известный как продуцент практически важных продуктов [2], [3], [4], [5]. Глубинное выращивание культуры и проверку способности образовывать внеклеточные гидролитические ферменты проводили на среде Чапека-Докса в присутствии 2 % древесно-растительных отходов: хвойные опилки, отруби пшеничные и кукурузные стержни. Культуру выращивали в колбах на качалках (220 об/мин.) в течение 2, 4 и 6 суток

при температуре 22–24°C. Посевным материалом служил двухсуточный мицелий, выращенный на жидком сусле 4<sup>0</sup> по Баллингу, который вносили в количестве 5 %. После завершения процесса культивирования в культуральной жидкости определяли: биомассу – весовым методом; редуцирующие сахара – феррацианидным методом на КФК-3 при длинах волн  $\alpha = 400$  и 420 нм (для глюкозы и ксилозы соответственно) согласно [6], [7]. Активность эндо-1,4- $\beta$ -D-глюкоказы ( $C_x$ ) – вискозиметрически по падению вязкости раствора 1% высокополимерной карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), а также по образованию редуцирующих веществ в результате гидролиза низкомолекулярной карбоксиметилцеллюлозы по методу Мендельса и Вебера. Активность фермента выражали в условных единицах. За единицу активности принимали такое его количество, которое катализирует образование 1 мг глюкозы в 1 мл за 1 час в оптимальных условиях опыта. Об активности ксиланазы судили по количеству редуцирующих сахаров, которые образовались при гидролизе соответствующего субстрата, в частности, 1%-ной суспензии ксилана. За единицу активности ксиланазы принимают такое количество фермента, которое образовывало 1 мг редуцирующих сахаров (в пересчете на глюкозу) [8].

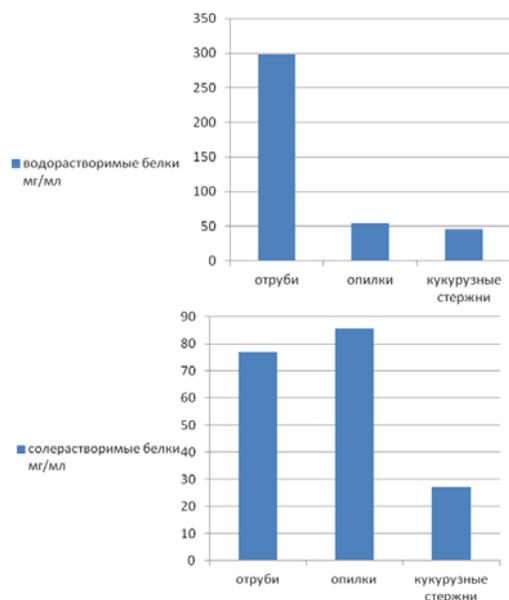


Рисунок 1 Водо- и солерастворимые белки культуральной жидкости *Nurotyces rosellus* на различных субстратах

### Обсуждение результатов

Изучение динамики роста микофильного гриба показало, что все субстраты способствуют хорошему росту культуры. Самым оптимальным источником углерода оказались пшеничные отруби, на которых рост культуры начинался уже в первые сутки и достигал максимума в на 4 сутки роста культуры. Наибольшая активность целлюлолитических ферментов отмечалась на среде с кукурузными стержнями, при этом количество целлюлазы составило 5,7 ед/мл, ксиланазы – 7,8 ед/мл (таблица 1). Высокая ксиланазная активность обусловлена видимо тем, что кукурузные стержни в основном состоят из ксилана. Кроме того, мы установили, что чем больше вязкость культуральной жидкости после культивирования гриба, тем выше ферментативная активность. Это происходит, по-видимому, в результате накопления ферментов в

Таблица 1. Активность ферментов на различных растительных субстратах

Субстрат	Вязкость $\eta_{кин}$ , сСТ	Ксиланазная активность, ед/мл	Целлюлазная активность, ед/мл
Хвойные опилки	1,55	5,04	2,5
Пшеничные отруби	1,81	6,2	4,5
Кукурузные стержни	2,98	7,8	5,7

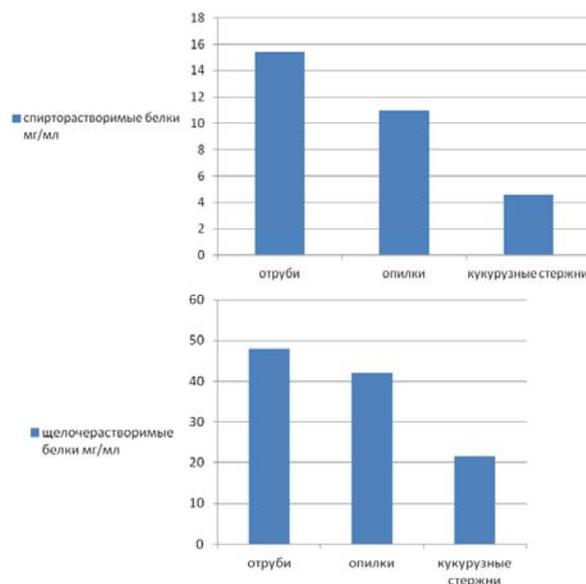


Рисунок 2 Спирто- и щелочерастворимые белки культуральной жидкости *Nurotyces rosellus* на различных субстратах

культуральной жидкости, которые представляют собой белковые молекулы, в связи с чем образуется коллоидная система.

Из литературных данных известно, что грибные белки имеют достаточно высокую биологическую ценность и хорошо усваиваются организмом поскольку содержат главным образом водо- и спирторастворимые фракции. Определение фракционного состава белка культуральной жидкости *Nuroomyces rosellus* выяви-

ло, что большая часть белков культуральной жидкости являются водо- и солерастворимыми. На пшеничных отрубях их количество достигало 298 и 76,9 мг/мл, на кукурузных стержнях – 45 и 27 мг/мл, на хвойных опилках 55 и 85,5 мг/мл соответственно. (рисунок 1, 2). Таким образом, микофильный гриб *Nuroomyces rosellus* ВКПМ F–242 является перспективным продуцентом ферментных препаратов для утилизации целлюлозосодержащих отходов.

14.11.2014

**Список литературы:**

1. Ферменты микроорганизмов /Под ред. А.А. Имшенецкого.– М:Наука, 1973. – 316 с.
2. Штамм *Nuroomyces rosellus* 94/77 – продуцент протеазного комплекса и препарата антибактериального и фунгицидного спектра действия. Авторское свидетельство СССР №1135189 / Е.Г. Торопова [и др.]. – Оpubл. 30.08.85. – Бюл. №32.
3. Буракаева, А.Д. Способ получения красителя / А.Д. Буракаева // Патент РФ №2065462, опубл.20.08.96, бюл.№23.
4. Способ получения смеси насыщенных углеводородов микробиологическим путем / А.Д. Буракаева [и др.] // Патент РФ №2439158, опубл. 10.01.2012 г., бюл.№1.
5. Буракаева, А.Д. Микофильные грибы – продуценты практически важных продуктов: монография / А.Д.Буракаева. – НОУ ВПО МТИ «ВТУ». – Оренбург. – Типография «Экспресс-печать», 2013. – 160 с.
6. Методы экспериментальной микологии. Справочник.– Киев: Наукова думка, 1982. – 550 с.
7. Филиппович, Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. – М.: Просвещение, 1982. – 311 с.
8. Сеницын, А.П. Методы изучения и свойства целлюлитических ферментов / А.П. Сеницын, В.М. Черноглазов, А.В. Гусаков // Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». – М. – 1990. – Т. 25. – 152 с.

Сведения об авторах:

**Буракаева Айгуль Дикатовна**, старший научный сотрудник ОАО «Научно-исследовательский и проектный институт экологических проблем», кандидат биологических наук

**Левин Евгений Владимирович**, генеральный директор ОАО «Научно-исследовательский и проектный институт экологических проблем», кандидат физико-математических наук

460037, г. Оренбург, ул. Караванная д. 6 А, тел. (3532) 372983, e-mail: aigulburakaeva@mail.ru