

Н. И. СТАЙЧЕНКО, Н. И. ФЕДОРОВ

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛОЖНОГО ОСИНОВОГО ТРУТОВИКА

(Представлено академиком АН БССР А. С. Вечером)

Гриб *Phellinus tremulae* (Bond.) Bond. et Boriss., являющийся возбудителем сердцевинной гнили осины, относится, по мнению ряда авторов (1, 2), к группе грибов, вызывающих коррозионно-деструктивный тип гниения древесины. Эти грибы могут использовать в качестве источника питания одновременно целлюлозу и лигнин — основные компоненты клеточной оболочки древесины.

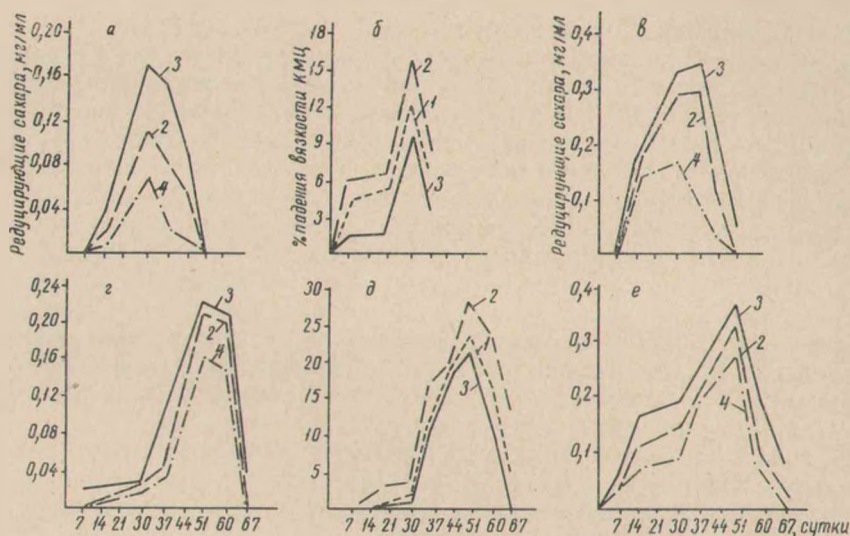
Быстрота распространения гнили внутри ствола и интенсивность разрушения древесины во многом зависят от активности окислительных и гидролитических ферментов дереворазрушающих грибов.

Разложение целлюлозы дереворазрушающими грибами осуществляется с помощью целлюлолитических ферментов, состоящих по крайней мере из двух компонентов: целлюлазы, которая катализирует распад полисахаридов до целлобиозы и других олигосахаридов, и β -глюкозидазы, гидролизующей эти продукты до глюкозы (3). Эти ферменты у дереворазрушающих грибов являются внеклеточными (4). Имеются сообщения о наличии целлюлазы у *Fomes igniarius* (L.) Gill. (5) и эндоцеллюлазы у *Ph. igniarius* (Quel.) (6). Нами изучалась целлюлазная активность фильтратов культуральной жидкости *Ph. tremulae* в зависимости от возраста культуры гриба, состава питательной среды и кислотности реакционной смеси при оптимальной температуре инкубации.

Ложный осиновый трутовик выращивали на 2-процентном пивном сусле с добавлением опилок и на синтетической среде с опилками. Рост происходил при комнатной температуре на качалке в течение 2 месяцев. Через каждые 7 суток определяли активность целлюлолитических ферментов в фильтрате культуральной жидкости. Об интенсивности действия целлюлазы судили по степени снижения начальной вязкости 0,3-процентного раствора карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) под действием культуральной жидкости. Для этого в вискозиметр Оствальда вносили 5 мл раствора КМЦ, 1 мл культуральной жидкости, 0,5 мл ацетатного буфера со значением pH 4,0; 5,0; 6,2 и измеряли начальную вязкость смеси, затем помещали на инкубацию в течение часа при 30°, после чего вновь замеряли вязкость. Параллельно активность целлюлазы определяли по увеличению количества редуцирующих сахаров по методу Нельсона и Сомогни (7, 8) в реакционной смеси, состоящей из 2,5 мл 2-процентного раствора КМЦ, 2 мл культуральной жидкости и 0,5 мл фосфатного буфера со значениями pH 5,0; 6,0; 7,0 до и после инкубации в течение часа при 30°C. При определении β -глюкозидазной активности методом Сомогни использовали реакционную смесь следующего состава: 4,5 мл культуральной жидкости, 5 мл раствора целлобиозы, 0,5 мл фосфатного буфера (pH 5,0; 6,0; 7,0). Смесь инкубировали в течение часа при 30°C.

Во всех случаях ставили контроль, в который вместо культуральной жидкости вносили дистиллированную воду.

Результаты исследований по определению активности целлюлолитических ферментов *Ph. tremulae* приведены на рисунке. Они показывают, что активность ферментов, катализирующих разложение целлюлозы, в сильной степени зависит от возраста культуры и других факторов. При выращивании *Ph. tremulae* на 2-процентном сусле с опилками образование целлюлазы началось после 7-суточного роста гриба, однако при дальнейшем развитии гриба активность фермента значительно возрастает и достигает максимума в 30-суточной культуре, после чего наблюдается ее сильное падение. После 50 суток роста гриба происходит инактивация целлюлазы в культуральной жидкости.



Активность целлюлолитических ферментов на пивном сусле (а, б, в) и синтетической среде (г, д, е); а, б, г, д — активность целлюлазы, в, е — активность β -глюкозидазы:

1 — pH=4,0; 2—5,0; 3—6,0; 4 — pH=7,0

В период максимальной целлюлазной активности гриба количество редуцирующих сахаров в культуральной жидкости возрастало до 0,1—0,16 мг/мл, а величина снижения вязкости раствора КМЦ при действии культуральной жидкости *Ph. tremulae* достигала 12—15%. При этом следует отметить, что в опыте мы использовали карбоксиметилцеллюлозу со степенью замещения 98. Исследования (7) показали, что наиболее высокая активность целлюлазы была получена при применении КМЦ со степенью замещения 36, а наиболее низкая — с КМЦ со степенью замещения 94. На рисунках г, д изображена целлюлазная активность культуральной жидкости осинового трутовика, выращенного на синтетической среде, где в качестве углеродного источника питания использованы древесные опилки. Кроме того, в питательную среду была внесена глюкоза из расчета 1 г на литр среды, способствовавшая началу роста мицелия. Несмотря на это, рост *Ph. tremulae* на этой среде происходил крайне медленно и наблюдалось слабое активирование целлюлазы в первые 30 суток, после чего интенсивность накопления целлюлазы резко возрастала и достигала максимума в 50-суточной культуре. Затухание целлюлазной активности отмечено после 70 суток роста гриба на синтетической среде с опилками по сравнению с пивным суслом.

Активность β -глюкозидазы, осуществляющей разложение целлобиозы и других олигосахаридов до глюкозы, достигает наибольшей величины в 37-суточной культуре при выращивании *Ph. tremulae* на пивном сусле и 50-суточной — на синтетической среде (рисунки в, е). При этом в про-

цессе роста гриба на пивном сусле с опилками накопление фермента шло более интенсивно, особенно в первые 30 суток, чем на синтетической среде. Очевидно, это зависит от состава питательной среды, на которой выращивался гриб. А именно, пивное сусло, имеющее в своем составе 12% сахаров, из которых 80% приходится на олигосахарид-мальтозу, представляет готовые субстраты для действия β -глюкозидазы. Это приводит к тому, что уже на 7-е сутки роста гриба проявляется активность этого фермента. Нами установлено, что наиболее доступными источниками углеродного питания *Ph. tremulae*, при наличии которых в питательной среде происходит наиболее быстрый рост мицелия, являются гексозы (глюкоза, фруктоза и мальтоза), что свидетельствует также о высокой активности β -глюкозидазы.

На активность целлюлолитических ферментов значительное влияние оказывает кислотность среды. Наиболее сильное активирование ферментов происходит при pH 5,0—6,0. Культуральная жидкость с нейтральной кислотностью (pH=7,0) характеризовалась наиболее низким уровнем активности целлюлазы и β -глюкозидазы. Как следует из литературных данных (⁹⁻¹¹), биологическое разложение лигнинового комплекса, связанного с целлюлозой, осуществляется с участием специфических оксидаз, выделяемых грибами, — возбудителями белой гнили древесины. Как показали наши исследования, *Ph. tremulae* обладает очень высокой фенолоксидазной активностью, которая проявляется с первых дней роста мицелия и достигает максимальной величины в 37-суточной культуре (питательная среда — пивное сусло). Таким образом, максимальное активирование целлюлолитических ферментов и окислительных ферментов у *Ph. tremulae* происходит примерно в одни и те же сроки.

Наличие и высокая активность комплекса целлюлолитических и окислительных ферментов у *Ph. tremulae* обеспечивают одновременное разрушение основных компонентов клеточных оболочек древесины.

Белорусский технологический институт имени С. М. Кирова

Поступило 12.VII 1968

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. И. Ванин, Изв. лесного института, вып. 36, Л., 1928. ² И. Я. Шемякин, Научные записки Воронежского лесотехнического института, т. 21, 1920. ³ Р. В. Фениксова, сб. «Ферментативное расщепление целлюлозы», М., 1967. ⁴ Н. Л. Маттисон, О. П. Низковская, там же. ⁵ H. Schmitz, J. Gen. Physiol., 2, 613, 616, 1920. ⁶ Н. Луг, Н. Ziegler, Phytopath., 2, 35, 1959. ⁷ Н. А. Родионова, Н. А. Тиунова и др., Прикладн. биохимия и микробиология, 2, вып. 2, 1966. ⁸ М. И. Верховцева Микробиология, 34, вып. 3, 1965. ⁹ Н. Луг, Planta, 48, 1956. ¹⁰ Н. Луг, Planta, 50, 1958. ¹¹ Р. Rösch, Arch. Mikrobiol., 38, 1961.