

УДК 582.28(634*443)

Н. І. ФЕДАРАУ, Т. М. МАРШЧАКІНА

АКТЫЎНАСЦЬ НЕКАТОРЫХ ФЕРМЕНТАЎ САСНОВАЙ І ЯЛОВАЙ ГУБАК

Сасновая (*Phellinus pini* (Thore ex Fr.) Pil.) і яловая губкі (*Phellinus pini* var. *abietis* (Karst.) Pil.) з'яўляюцца ўзбуджальнікамі стратых сітавых гнілей хвойных парод. Гэтыя грыбы выкарыстоўваюць у якасці крыніцы жыўлення цэлюлозу і лігнін, прычым у працэсе метабалізму спачатку раскладаюць лігнін, затым цэлюлозу, выклікаючы каразійны тып гніення драўніны [1], г.зн. у працэсе раскладання ўдзельнічаюць як акісляльныя, так і гідралітычныя ферменты з перавагай першых. Адным з асноўных пазаклетачных энзімаў, якія ўдзельнічаюць у раскладанні лігніну, з'яўляюцца поліфенолаксідаза (лаказа) і пераксідаза. Разбурэнне цэлюлозы ажыццяўляецца таксама пры ўдзеле цэлага комплексу ферментаў. У літаратуры ёсць звесткі [2—4] аб наяўнасці лаказы і пераксідазы ў *Phellinus pini*. Вывучэнне ферментатыўнай актыўнасці сасновай і яловай губак з'явілася часткай нашых даследаванняў параўнальных біялагічных асаблівасцей гэтых грыбоў для вывятлення пытання іх відавой таксанаміі, якое да гэтага часу застаецца спрэчным. Рад айчынных вучоных ([5—10] і інш.) адносяць яловую губку да варыяцый асноўнага віду, класіфікуючы яе як *Phellinus pini* var. *abietis* (Karst.) Pil. Еўрапейскія аўтары лічаць *Phellinus abietis* самастойным відам, раней названым Фрызам *Polyporus chrysoloma* (цйт. па [11]). Донк, які прытрымліваецца аналагічнай думкі, дае грыбу новую назву — *Phellinus chrysoloma* (Fr.) Donk [11]. Столперс [12] на аснове адrozenняў па культуральна-марфалагічных прыкметах таксама прадстаўляе сасновую *Ph. pini* (Thore ex Fr.) Pil. і яловую *Ph. chrysoloma* (Fr.) Donk губкі як самастойныя віды. Аўтары работ [13, 14] адзначалі, што пытанне відавой прыналежнасці сасновай і яловай губак патрабуе дэталёвага вывучэння, г.зн. неабходны цэлы комплекс эксперыментальных даследаванняў для абгрунтавання іх таксанамічнага становішча.

Правядзенне біяхімічных даследаванняў заключалася ў вывучэнні лаказнай і пераксідазнай актыўнасці сасновай і яловай губак, а таксама ферменту C_1 — кампанента цэлюлазнага комплексу, здольнага разбураць крышталічную структуру цэлюлозы.

Для доследу было выкарыстана 9 штамаў грыбоў, выдзеленых з пладовых целаў, якія развіваюцца ў розных экалагічных умовах. Раслінамі-гаспадарамі даследуемых грыбоў былі розныя віды сасны і елкі. Штамы *Ph. pini*: шт. 38,11 — гаспадар — сасна звычайная, БССР; шт. 60 — гаспадар — сасна Сасноўскага, ГССР; шт. 474 — гаспадар — сасна звычайная, Краснаярскі край. Штамы *Ph. pini* var. *abietis*: шт. 1Е, 6Е — гаспадар — елка звычайная, БССР; шт. 58 — гаспадар — елка аянская, Хабараўскі край; шт. 59 — гаспадар — елка ўсходняя, ГССР; шт. 218^к — гаспадар — елка Шрэнка, КіргССР. Штамы грыбоў, якія

уяўляюць сабой асацыяцыі сасновай і яловай губак у лясках Беларусі, былі атрыманы аўтарамі ў працэсе фітапаталагічнага абследавання адпаведных насаджэнняў рэспублікі. Штамы 474 і 218^к былі прадастаўлены нам акадэмікам Э. Х. Пармаста (Інстытут заалогіі і батанікі АН ЭССР). Штамы 59 і 60 выдзелены з пладовых целаў, атрыманых ад загадчыка аддзела лясной фітапаталогіі АН ГССР Б. Л. Тавадзе, а штамы 58 выдзелены з пладовых целаў, атрыманых з ДальНДІЛГ ад навуковага супрацоўніка Г. Юрчанка, за што аўтары выказваюць глыбокую ўдзячнасць усім памянёным вышэй вучоным.

Міцэлій грыбоў вырошчвалі ў вадкім асяроддзі наступнага саставу: на 1 л вады было ўзята 10 г глюкозы, 1 г KH_2PO_4 , 0,5 г MgSO_4 , 0,5 г KCl , 0,01 г FeSO_4 , 2 г пептону, 100 мл дражджавога аўталізату, 20 г бярозавых апілак. У колбы Эрленмейера ёмістасцю 250 мл налівалі па 50 мл пажыўнага асяроддзя і стэрылізавалі ў аўтаклаве пры ціску 0,5 атм трохкратна па 30 мін. Інакуляцыю рабілі кавалачкамі міцэлію, папярэдне вырашчанага на сусла-агаравым асяроддзі. Рост культур адбываўся на качалцы на працягу 40 сут. Праз кожныя 10 сут здымалі рэзультат, замервалі кіслотнасць фільтрату культуральнай вадкасці, вызначалі назапашванне біямасы міцэлію і актыўнасць ферментаў у фільтрате кожнага штама.

Актыўнасць лаказы (поліфенолаксідазы) вызначалі па метаду Равіна і Харварда [15], пераксідазы — па метаду, заснаванаму на змяненні інтэнсіўнасці афарбоўкі прадукту акіслення *o*-дыянізідыну перакісам вадароду, утворанага пры дзеянні пераксідазы [16]. Актыўнасць пераксідазы разлічвалі на 1 мл культуральнай вадкасці. Адзінка актыўнасці пераксідазы адпавядала колькасці ферменту, каталізуючага пераўтварэнне 1 мкмоль H_2O_2 за 1 мін. Актыўнасць ферменту C_1 вызначалі па метаду Нельсана і Сомаджы [17]. У якасці субстрату прымянялі фільтравальную паперу, ватман № 2.

Вынікі нашых даследаванняў зведзены ў табл. 1 і 2. Эксперыментальныя даныя паказваюць, што ў працэсе росту грыбоў адбывалася паступовае назапашванне біямасы міцэлію (табл. 1). Максімальную скорасць назапашвання міцэліяльнай масы сасновая губка паказвала ў першыя 10 сут росту, яловая губка — у наступныя. Максімальнае назапашванне міцэлію абодвух грыбоў прыходзілася на 30-я сут росту (акрамя шт. 38). У далейшым пачынаўся распад (лізіс) міцэлію, аб чым сведчаць зніжэнне масы міцэлію і слабае памутненне культуральнай вадкасці на 40-я сут назірання.

Характар рэгулявання кіслотнасці асяроддзя быў індывідуальны для кожнага штама. Агульнай заканамернасцю з'яўлялася тое, што ў ходзе доследу назіралася паступовае зніжэнне кіслотнасці асяроддзя (пасля аўтаклавіравання рН асяроддзя раўнялася 5,3). Максімальнае назапашванне міцэліяльнай масы адбывалася пры рН вышэй чым 6, а ў шт. 58, 218^к — пры рН 7,1 і 7,2, г. зн. назіралася значнае падшчэлачнае асяроддзя.

Вынікі доследу, прыведзеныя ў табл. 2, паказваюць, што актыўнасць ферментаў у значнай ступені залежала ад узросту культур і разнавіднасці грыба. Паказчыкі ферментатыўнай актыўнасці змяняліся ў бок павелічэння амаль ва ўсіх штамаў прапарцыянальна назапашванню біямасы міцэлію. Па сярэдніх даных (рысункі), сасновая і яловая губкі мелі неаднолькавую ферментатыўную актыўнасць. Так, актыўнасць пераксідазы ў сасновай губкі рэзка ўзрастала ў першыя паміж 10-і і 30-і сут росту і дасягала максімуму ў часе найбольшага назапашвання міцэліяльнай масы. У яловай губкі адбывалася больш маруднае нарастанне пераксідазнай актыўнасці, а максімальны паказчык актыўнасці

Табліца 1

Рост міцэлію сасновай і яловай губак на вадкім пажыўным асяроддзі

Нумар штама, назва грыба	Час вырошчвання, сут								
	10		20		30		40		
	pH	маса, мг	pH	маса, мг	pH	маса, мг	pH	маса, мг	
<i>Ph. pini</i> var. <i>abietis</i> :									
1E	5,3	67,5	5,8	274,5	6,1	285,0	6,5	193,7	
6E	5,3	92,2	6,4	204,9	6,5	222,9	7,1	169,9	
58	5,5	36,1	6,9	165,0	7,1	229,5	6,8	190,1	
218к	5,5	89,5	6,5	218,3	7,2	227,9	7,2	196,4	
59	5,3	116,5	6,3	178,3	6,5	257,5	7,0	159,1	
<i>Ph. pini</i> :									
60	5,4	73,1	5,8	156,8	6,8	227,6	7,2	175,1	
38	5,1	113,1	6,3	289,1	7,3	254,6	7,4	211,5	
11	5,1	173,1	5,9	264,4	6,8	280,4	6,7	201,1	
474	5,2	175,0	5,7	230,4	6,8	243,3	7,7	159,4	

Табліца 2

Змяненні актыўнасці ферментаў сасновай і яловай губак

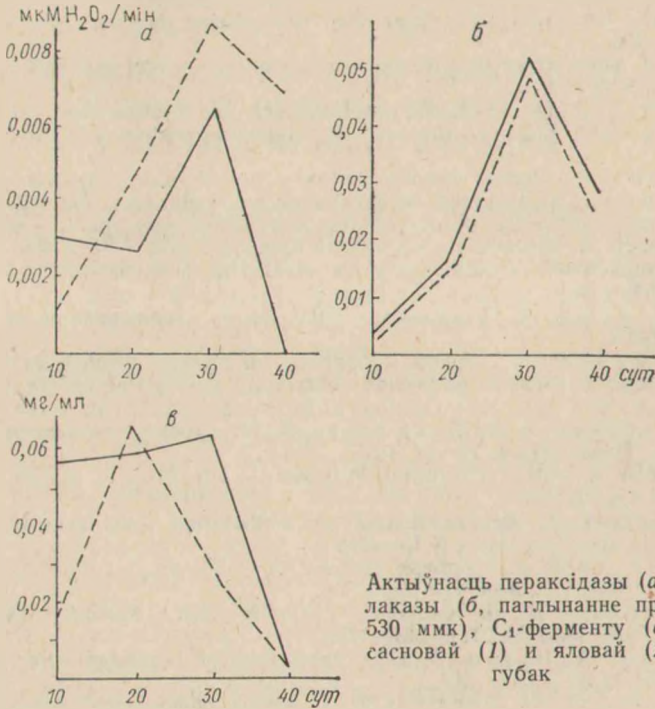
Нумар штама, назва грыба	Лаказа, паглынанне пры 530 мкм				Пераксідаза, адз. актыўн., мкм Н ₂ О ₂ /мін				Цэлюлаза С ₁ , мг/мл глюкозы				
	Час вырошчвання, сут												
	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	
<i>Ph. pini</i> var. <i>abietis</i> :													
1E	0	0,015	0,055	0,020	0	0,0015	0,0041	0	0,059	0,042	0,086	0	
6E	0	0,035	0,062	0,023	0,0087	0,0041	0,0028	0	0,061	0,067	0,065	0,01	
58	0,004	0,007	0,036	0,030	0,0063	0,0031	0,0118	0	0,048	0,086	0,03	0	
59	0,008	0,025	0,053	0,026	0	0,0037	0,0096	0	0,050	0,039	0,074	0	
218к	0	0,004	0,053	0,038	0	0,0015	0,0022	0	0,060	0,039	0,058	0	
<i>Ph. pini</i> :													
60	0	0,008	0,059	0,022	0,0015	0,0022	0,0056	0,0046	0	0,058	0,041	0	
38	0,006	0,018	0,054	0,012	0	0,0072	0,0065	0,0065	0	0,010	0,040	0	
11	0	0,025	0,046	0,026	0	0,0032	0,0106	0,0094	0,039	0,065	0,025	0	
474	0	0,008	0,039	0,029	0,0034	0,0065	0,0118	0,0063	0,025	0,097	0,039	0,01	

гэтага ферменту ў яловай разнавіднасці быў значна ніжэй, чым у сасновай. З графіка (рысунк, а) відаць, што ў цэлым пераксідазная актыўнасць сасновай губкі памнога перавышае актыўнасць яловай губкі. Пры аналізе таблічных даных гэтыя адрозненні асабліва відавочныя паміж штамамі сасновай губкі, узятымі на сасне звычайнай, і штамамі яловай губкі, узятымі на слцы звычайнай. Акрамя гэтага, калі на 40-я сут пры наступленні частковага лізісу міцэлію актыўнасць пераксідазы ва ўсіх штамаў яловай губкі не была адзначана, то ў сасновай губкі яна заставалася на даволі высокім узроўні.

Характар нарастання актыўнасці лаказы ў абодвух грыбоў прыкладна аднолькавы (рысунк, б). У першыя 10 сут вырошчвання назіралася слабае актывіраванне лаказы, пасля чаго інтэнсіўнасць назапашвання ферменту рэзка ўзрастала і дасягнула максімуму на 30-я сут. Зніжэнне лаказнай актыўнасці даследуемых грыбоў таксама адзначана на 40-я сут назірання. У дадзеным выпадку паказчыкі актыўнасці лаказы ў яловай губкі перавышалі паказчыкі актыўнасці яе ў

сасновай губкі. Лір [3] адзначаў, што разбуральнікі абалоннай драўніны характарызуюцца пераважна ўтварэннем лаказы. Магчыма, гэтым часткова можна растлумачыць і вынікі нашых даследаванняў, улічваючы тое, што яловая губка здольна разбураць як спелую драўніну, так і абалону елкі.

Актыўнасць ферменту C_1 (рысунак, в), якая вызначаецца па колькасці назапашвання рэдукуючых цукраў у культуральнай вадкасці, таксама была рознай у сасновай і яловой губак. Калі штамы яловой губкі на 10-я сут мелі даволі высокі паказчык актыўнасці, які, пасту-



Актыўнасць пераксідазы (а), лаказы (б, паглыннанне пры 530 мкм), C_1 -ферменту (в) сасновай (1) і яловой (2) губак

нова нарастаючы, дасягаў максімуму на 30-я сут і рэзка падаў у перыяд наступлення аутолізу міцэлію, то ў сасновай губкі на 10-я сут актыўнасць ферменту была невысокай, аднак хутка нарасталала і дасягнула максімуму на 20-я сут.

Такім чынам, у выніку нашых даследаванняў устаноўлена, што культуры сасновай і яловой губак адрозніваліся паміж сабой па актыўнасці акісляльных ферментаў і гідралітычнага ферменту C_1 .

Сасновая губка характарызавалася высокай пераксідазнай актыўнасцю, якая заставалася на высокім узроўні нават пры частковым лізісе міцэлію. У яловой губкі актыўнасць пераксідазы была значна ніжэй, а на 40-я сут наступала поўная яе інактывацыя.

Паказчыкі актыўнасці лаказы яловой губкі перавышалі лаказную актыўнасць сасновай губкі.

Перыяды максімальнага актывіравання цэлюлазітычнага ферменту C_1 грыбоў, якія даследаваліся, не супадалі, прычым характар нарастання актыўнасці гэтага ферменту ў сасновай і яловой губак быў неаднолькавы.

Такім чынам, эксперыментальныя даныя, прыведзеныя вышэй, побач з іншымі паказчыкамі павінны ўлічвацца пры ацэнцы таксанамічнага становішча грыбоў, якія даследуюцца.

Summary

Results of the investigations on enzymatic activities of *Phellinus pini* and *Phellinus pini* var. *abietis* are given in the paper. The authors have studied the activities of peroxidase, laccase and C_1 enzyme. Essential differences between the fungi in accumulation of peroxidase and C_1 enzyme are found.

Літаратура

1. Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов.— М.: Лесная промышленность, 1967.— 276 с.
2. Лур Н. Untersuchungen über die Peroxydasen höherer Pilze.— *Planta*, 1956, Bd 48, S. 239—256.
3. Лур Н. Vorkommen von Peroxydase bei holzzerstörenden Basidiomycetes.— *Planta*, 1955, Bd 46, S. 408—413.
4. Лур Н. Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm-Reaktion.— *Planta*, 1958, Bd 50, S. 359—370.
5. Ванни С. И. Лесная фитопатология.— М.— Л.: Гослесбумиздат, 1955.— 416 с.
6. Шварцман С. Р. Гетеробазидиальные (*Auriculariales*, *Tremellales*, *Dacryomycetales*) и автобазидиальные (*Ectobasidiales*, *Aphylophorales*) грибы.— Флора споровых растений Казахстана. Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1964, т. 4, с. 436—439.
7. Визначник грибів України / Под ред. Н. И. Пидопличко.— Киев: Наукова думка, 1972, т. 5, с. 164—165.
8. Ячевский А. А. Определитель грибов.— М.: Товарищество И. Н. Кушнеров и К°, 1897.— 240 с.
9. Бондарцев А. С. Грибы, собранные на стволах лесных пород в Брянском опытном лесничестве.— Труды по лесному опытному делу в России. СПб, 1912, вып. 37, с. 56.
10. Любарский Л. В., Васильева Л. Н. Дереворазрушающие грибы Дальнего Востока.— Новосибирск: Наука, 1975.— 164 с.
11. Donk M. A. Notes on european Polypores.— VII. Proc. K. Nederl. Akad. Wet. (c), 1971, vol. 74, N 1, p. 25—41.
12. Stalpers J. A. Identification of wood-inhabiting Aphylophorales in pure culture.— *Studies in Mycology*, 1978, N 16.— 248 p.
13. Пармасто Э. Х. Трутовые грибы Севера Советского Союза.— Микология и фитопатология, 1967, т. 1, вып. 4, с. 280—286.
14. Любарский Л. В. Сосновая губка в ДНК.— Вестник Дальневосточного филиала АН СССР, 1936, № 21, с. 113—123.
15. Ravin H. A., Harvard M. D. Rapid test for hepatolenticular degeneration.— *The Lancet*, 1956, N 19, p. 646—647.
16. Гудкова Л. В., Дегтярь Р. Г. Метод определения активности пероксидазы.— Ферменты в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Киев: Наукова думка, 1968, с. 172—173.
17. Кудряшова Т. И., Сидорова И. И., Фениксова Р. В. Целлюлаза плесневых грибов тропических стран.— Микология и фитопатология, 1974, т. 8, вып. 3, с. 214—219.

Белорусский технологический институт
ил. С. М. Кирова

Поступила в редакцию
24.06.80