

УДК 582.28

Н. И. ФЕДОРОВ, Н. И. СТАЙЧЕНКО

**ДЫХАНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ГРИБА  
PHELLINUS TREMULAE (BOND.) BOND. ET BORISS.***(Представлено академиком АН БССР В. Ф. Купревичем)*

Гриб *Phellinus tremulae* является возбудителем сердцевинной гнили стволов осины — одного из наиболее опасных и распространенных заболеваний осиновых насаждений. Разработка эффективных мер борьбы с этим заболеванием невозможна без детального и всестороннего изучения биологических особенностей его возбудителя.

Известно, что дыхание является одним из важнейших свойств растительных организмов, в том числе и дереворазрушающих грибов. В результате этого процесса освобождается энергия химических веществ и создаются условия для использования ее в синтезе органических веществ и других процессах жизнедеятельности грибов.

Характер развития дереворазрушающих грибов и скорость разрушения ими древесины во многом зависит от наличия и активности гидролитических и окислительных ферментов этих грибов. Данные по активности ряда окислительных ферментов *Ph. tremulae* имеются в работах (5-8).

Сведения об интенсивности дыхания ложного осинового трутовика в отечественной литературе отсутствуют.

В настоящей работе была изучена энергия дыхания и активность окислительных ферментов плодовых тел и вегетативного мицелия *Ph. tremulae* в чистой культуре.

Мицелий гриба выращивается на пивном сусле (8% по содержанию сахара) на качалке при комнатной температуре в течение 6—8 недель. Определение активности окислительных ферментов и энергии дыхания мицелия проводилось через каждую неделю.

Энергия дыхания, активность полифенолоксидаз, тирозиназы, цитохромоксидазы и аскорбиноксидазы определялись манометрически в приборе Варбурга.

Определение активности каталазы осуществлялось газометрическим способом (2), пероксидазы — колориметрическим (1).

При изучении полифенолоксидазной активности гриба в качестве субстратов были использованы пирогаллол, пирокатехин с гидрохиноном, резорцин, флороглюцин и галловая кислота. При определении цитохромоксидазы, тирозиназы и аскорбиноксидазы субстратами соответственно служили цитохром с гидрохиноном, тирозин и аскорбиновая кислота.

Для установления энергии дыхания, активности пероксидазы и каталазы брали навеску мицелия в 500 мг, отфильтрованную от культуральной жидкости. При изучении активности остальных окислительных ферментов вышеуказанную навеску мицелия растирали в ступке до кашецеобразного состояния с 5 мл фосфатного буфера (рН 7,2).

**Результаты исследований.** Наиболее интенсивно процессы дыхания проходят в гимениальном слое плодовых тел гриба (табл. 1). Энергия дыхания плодородной части значительно превышает интенсивность окислительных процессов таких органов растения-хозяина, как листья и побеги. Это связано с потреблением большого количества питательных веществ и энергии при образовании и рассеивании огромного числа зрелых жизнеспособных спор. Так, исследования, проведенные нами, показали, что 1 см<sup>2</sup> поверхности гимениального слоя плодового тела ложного осинового трутовика во время интенсивной споруляции образует до

Таблица 1

Энергия дыхания <i>Ph. tremulae</i>	Поглощение O <sub>2</sub> (в мкл) 1 г мицелия за 1 час	
	воздушный мицелий	погруженный мицелий
	—	400
7	—	400
14	993	369
21	722	356
30	522	212
37	433	203
44	285	116
51	178	44

Гимениаль-  
ный слой  
плодово-  
го тела

1184

Бесплодная  
ткань

85

Таблица 2

Активность каталазы <i>Ph. tremulae</i>	Активность каталазы, мкл O <sub>2</sub> г/мин	
	воздушный мицелий	погруженный мицелий
	—	4
7	—	4
14	—	31
21	243	101
30	654	226
37	240	195
60	201	150

Гимениальный  
слой плодово-  
вого тела

27

Бесплодная  
ткань

0

миллиона спор в сутки. Такая интенсивность образования спор и связанная с ней дыхательная активность гименофора возможна только в условиях хорошей аэрации.

Бесплодная ткань плодового тела, представленная многолетним мицелием, имеет очень низкий уровень дыхания, что свидетельствует о его незначительном участии в процессах жизнедеятельности гриба.

Окислительные процессы, происходящие в вегетативном мицелии гриба, в значительной степени зависят от его возраста и условий аэрации.

Наиболее высокая дыхательная активность грибницы наблюдается в первые 3 недели, с увеличением возраста культуры энергия дыхания резко снижается.

Существенные различия получены в интенсивности дыхания воздушного и погруженного в культуральную жидкость мицелия.

Воздушный мицелий в 14-суточной культуре незначительно уступает по энергии дыхания гимениальному слою плодового тела.

Погруженный мицелий, развивающийся в условиях недостаточной аэрации, характеризуется более слабым уровнем дыхательной активности.

Вполне естественно, что грибница ложного осинового трутовика, развиваясь в древесине центральной части ствола, испытывает определенный дефицит в кислороде воздуха. Исследованиями (4) установлено, что в древесине с начальными стадиями загнивания, в которой располагается наиболее жизнедеятельный мицелий гриба, создается специфический газовый режим, который поддерживается на определенном уровне. Концентрация кислорода в газовой смеси, заполняющей полости клеток

пораженной древесины, составляет всего лишь 0,4 мг/л, в то время как содержание углекислого газа примерно в 440 раз выше атмосферной концентрации. Несмотря на такое низкое содержание кислорода, грибница ложного осинового трутовика успешно развивается и вызывает интенсивное разрушение древесины. Очевидно, дереворазрушающие грибы, обладая мощной ферментативной системой, способны при недостатке кислорода осуществлять различные типы брожений. Большая роль в окислительных процессах, особенно на завершающих его этапах, принадлежит различным оксидазам. Результаты проведенных нами исследований (табл. 2, 3) показывают, что гриб *Ph. tremulae* характеризуется высокой активностью окислительных ферментов.

Таблица 3

Активность полифенолоксидаз *Ph. tremulae*

Возраст мицелия, сутки	Поглощение O <sub>2</sub> (в мкл) 1 г мицелия за 1 час				
	субстраты				
	пирогаллол	пирокатехин	галловая кислота	флороглюцин	резорцин
7	1709	940	—	—	—
14	2228	1259	17	—	—
21	4827	3194	457	610	—
30	5711	6849	483	397	209
37	6174	7734	76	232	85
44	1580	2689	—	204	—
Гимениальный слой плодового тела	720	622	191	55	50
Бесплодная ткань	594	375	22	25	90

Характерно, что завершающий этап окисления у ложного осинового трутовика, как и у высших растений, катализируется несколькими оксидазами. Наличие многокомпонентной системы оксидаз у растений Е. В. Арциховская и Б. А. Рубин<sup>(3)</sup> рассматривают как важное приспособление свойств этих организмов к различным условиям внешней среды.

Активность отдельных окислительных ферментов не остается постоянной, а изменяется с ростом гриба, при этом активирование оксидаз достигает наибольшей величины в 21—37-суточном мицелии. С увеличением возраста гриба активность их снижается.

Мицелий *Ph. tremulae* имеет наиболее высокую каталазную и полифенолоксидазную активность. Активность каталазы достигает максимума в месячной культуре. Особенно высокая активность наблюдается у воздушного мицелия; погруженный мицелий в начальный период развития характеризуется слабой каталазной активностью; с увеличением возраста культуры различия в активности каталазы воздушного и погруженного мицелия уменьшаются.

Значительное место в процессах окисления принадлежит фенолоксидазам. Грибы, вызывающие белую гниль древесины, в том числе и *Ph. tremulae*, осуществляют одновременное разрушение полисахаридной части древесины и лигнина. По данным работ<sup>(6-9)</sup> (др), биологическое разложение лигнинового комплекса, связанного с целлюлозой, производится при участии специфических оксидаз, выделяемых лигнинразрушающими грибами. При этом наибольшее значение в разрушении лигнина, по мнению большинства авторов, имеет лакказа, входящая в группу фенолоксидаз и окисляющая пирогаллол.

Грибница *Ph. tremulae* характеризуется высокой фенолоксидазной активностью. Особенностью фенолоксидаз является способность к окис-

лению различных субстратов. Из пяти взятых нами субстратов наибольшая активность наблюдалась при окислении пирокатехина и пирогаллола (фермент лакказы). Вероятно, образование этих специфических фенолоксидаз связано с процессами биологического разложения лигнина. Значительная активность фенолоксидаз проявляется уже в первые дни роста мицелия и в последующем все время возрастает, достигая максимальной величины в 37-дневной культуре.

Грибница *Ph. tremulae*, как и многие лигнинразрушающие грибы, выделяет в субстрат или питательную среду фенолоксидазы, которые при взаимодействии с галловой кислотой или танином образуют характерный коричневый пигмент, благодаря которому грибница ложного осинового трутовика и культуральная среда окрашиваются в темно-коричневый цвет.

Нашими опытами установлено, что грибная пероксидаза в вегетативном мицелии *Ph. tremulae* отсутствует, что согласуется с данными работы (5). Вполне очевидно, что разложение перекисей, образующихся в процессе жизнедеятельности этого гриба, осуществляется с участием каталазы.

Из других окислительных ферментов отмечена значительная активность цитохромоксидазы, тирозиназы и аскорбинооксидазы. При этом наибольшее окисление аскорбиновой кислоты наблюдается в 21-суточной культуре гриба, а максимальное активирование цитохромоксидазы совпадает с периодом наибольшей активности фенолоксидаз; активность тирозиназы стимулируется в 20—30-дневной культуре. Эти исследования показывают, что в процессе развития гриба в культуре происходит смена окислительных систем. Вначале наибольшую активность имеет аскорбиноксидаза (21-суточная культура), затем каталаза и тирозиназа (30-суточная культура), и через неделю наступает максимальное активирование цитохромоксидазы и полифенолоксидаз.

Плодовые тела ложного осинового трутовика характеризуются относительно слабой активностью окислительных ферментов, особенно низка активность оксидаз в бесплодной ткани плодового тела.

Исключение составляет аскорбиноксидаза и цитохромоксидаза, активность которых примерно одинакова как в гимениальном слое, так и в бесплодной ткани плодовых тел.

Выделение фенолоксидаз в культурную среду является характерным признаком для лигнинразрушающих грибов. Определение активности этих ферментов в культуральной жидкости показало, что наибольшая фенолоксидазная активность наблюдается при окислении пирогаллола (фермент лакказа). При этом уровень фенолоксидазной активности при выращивании мицелия *Ph. tremulae* в течение 7 недель изменялся в незначительных пределах от 144 до 179  $\mu\text{л O}_2$  /час.

Интенсивное образование и выделение мицелием *Ph. tremulae* фенолоксидаз в культуральную среду свидетельствует о том, что биологическое разложение лигнина древесины осины происходит на протяжении значительного периода развития грибницы.

Белорусский технологический институт  
им. С. М. Кирова

Поступило 4.IV 1968

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. Н. Бояркин, Биохимия, 16, в. 4, 1951. <sup>2</sup> Н. Н. Иванов, Методы физиологии и биохимии растений, М., 1946. <sup>3</sup> Б. А. Рубин, Е. В. Арциховская, Биохимическая характеристика устойчивости растений к микроорганизмам, М.—Л., 1948. <sup>4</sup> В. А. Соловьев, Автореф. канд. дисс., Л., 1967. <sup>5</sup> J. Hiorth, Medd. Norskeskogfersksvesen, 20, № 4, 253, 1965. <sup>6</sup> Н. Лыг, Planta, 48, 239, 1956. <sup>7</sup> Н. Лыг, Planta, 50, 359, 1958. <sup>8</sup> Н. Лыг, Enzymologia, 23, 231, 1961. <sup>9</sup> R. Rösch, Arch. Mikrobiol., 38, 1961.