

БИОТЕХНОЛОГИЯ

6.11

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**

В номере

- **Метагеномика и ее вклад в биотехнологию**
- **Система для экспонирования белков на клетках *Yarrowia***
- **Фотобиотехнология для очистки сточных вод**

**Главный редактор
В.Г. ДЕБАБОВ**

Редакционная коллегия: М.Ю. Бебуров, В.В. Бирюков, А.М. Боронин, М. Yu. Galperin (США),
А.В. Глазунов, И.О. Гордон (отв. секретарь), М.В. Иванов, С.В. Костров,
С.В. Машко, А.И. Мирошников, А.М. Носов, К.Г. Скрябин, А. Ya. Strongin (США),
А.Г. Тоневицкий (зам. главного редактора), В.И. Швец

Редакция журнала
И.О. Гордон, С.Г. Емельянова,
И.А. Северина, О.В. Боровкова

Адрес: 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, дом 1

Телефон редакции (495) 315-08-01

Факс (495) 315-05-01

e-mail: editor@genetika.ru

<http://www.genetika.ru/journal>

БИОТЕХНОЛОГИЯ

6.2011 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Издается с мая 1985 г.

Выходит 6 раз в год

Москва

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Новости биотехнологии 3

Biotechnology News 3

Проблемы, перспективы

Problems and Prospects

Шестаков С.В. Вклад метагеномики в развитие биотехнологии 8

Shestakov S.V. Impact of Metagenomics into Biotechnology Development 8

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

Producers, Biology, Selection, and Gene Engineering

Юзбашева Е.Ю., Юзбашев Т.В., Гвилава И.Т., Синецкий С.П. Разработка системы экспозиции белков на поверхности клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica* с помощью белка клеточной стенки YIP1 23

Yuzbasheva E.Yu., Yuzbashev T.V., Gvilava I.T., and Sineckii S.P. Display of Proteins on the *Yarrowia lipolytica* Yeast Cell Surface using the YIP1 Cell Wall Protein 23

Смирнова Т.А., Шевлягина Н.В., Николаенко М.А., Сорокин В.В., Зубашева М.В., Азизбекян Р.Р. Характеристика спор и кристаллов *Brevibacillus laterosporus* 29

Smirnova T.A., Shevlyagina N.V., Nikolaenko M.A., Sorokin V.V., Zubasheva M.V., and Azizbekyan R.R. Characterization of *Brevibacillus laterosporus* Spores and Crystals 29

Тодосийчук Т.С., Кокот В., Дзыгун Л.П., Линовицкая В.М. Скрининг новых продуцентов целлюлолитических ферментных комплексов для процессов производства ткани 38

Todosiychuk T.S., Kokol V., Dzygun L.P., and Lino-vitskaya V.M. Screening of Novel Producers of Cellulolytic Enzyme Complexes for Textile Processes 38

Серпова Е.В., Кшиковская С.А., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма 47

Serpova E.V., Kishkovskaya S.A., Martynenko N.N., and Naumova E.S. Molecular Genetic Identification of Wine Yeasts of the Crimea 47

Технология биопрепаратов

Biologicals Technology

Лобанова Н.В., Трусова И.Н., Благодатских Е.Г., Копылова О.И., Ермолина Л.В., Сауткина Е.Н., Хамитов Р.А., Сергеев Ю.А. Оптимизация процесса культивирования клеток *CHO*, экспрессирующих рекомбинантный интерферон-бета 55

Lobanova N.V., Trusova I.N., Blagodatskikh E.G., Kopylova O.I., Ermolina L.V., Sautkina E.N., Khamitov R.A., and Sergeyev Yu.A. Optimization of Culturing of *CHO* Cells Expressing Recombinant Interferon- β 55

УДК 582.284.3 + 577.151.5

Т.С. ТОДОСИЙЧУК¹, В. КОКОЛ², Л.П. ДЗЫГУН¹, В.М. ЛИНОВИЦКАЯ^{1,*}

¹ Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», Киев, Украина, 03056

² Институт конструирования материалов и дизайна, Университет Марибора, Марибор, Словения, SI-2000

e-mail: vmail@bigmir.net

vanja.kokol@uni-mb.si

Скрининг новых продуцентов целлюлолитических ферментных комплексов для процессов производства ткани

В работе представлены результаты отбора базидиомицетов с повышенной целлюлолитической активностью. Исследован состав, специфическая активность ферментных комплексов и условия ее проявления у штаммов *Schizophyllum commune* 5009 и *Laetiporus sulphureus* 1774. Установлена принадлежность ферментов к кислым и нейтральным целлюлазам с оптимальной активностью при pH 5–7 и температуре 45–55°. Показана эффективность применения данных ферментов в процессах финишной обработки ткани.

Ключевые слова: биосинтез, процессы производства ткани, ферментные комплексы, целлюлазы, *Laetiporus sulphureus*, *Schizophyllum commune*.

Проблемы охраны окружающей среды определяют использование в различных отраслях промышленности, в том числе текстильной, ответственных подходов к обработке сырья и полупродуктов. Этим требованиям отвечает применение ферментов на разных этапах производства ткани.

К числу наиболее изученных относятся процессы ферментативной обработки натуральных волокон на стадиях окраски, отбеливания и полировки; они осуществляются с использованием различных препаратов пектиназ, целлюлаз, протеиназ, оксидаз и др. [1–4]. Среди применяемых ферментов целлюлазы приобрели особое значение в процессах финишной обработки текстильных материалов на основе целлюлозы. Разглаживая («шлифуя») поверхность волокон, они предотвращают скатывание, повышают мягкость изделий, а также усиливают адсорбцию красителей в ткани [5, 6].

Целлюлазы способны к модифицированию поверхности целлюлозных волокон, вызывая изменения их структурных и механических свойств [7–9]. Целлюлолитические комплексы, проявляя активность различных деполимераз — целобигидролаз (КФ 3.2.1.91) и эндоглюканазы (КФ 3.2.1.4), а также β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21), — поэтапно осуществляют гидролиз молекулы целлюлозы по 1,4-β-D-гликозидной связи.

Так как ферментативная обработка, особенно в случае применения ферментных комплексов, может привести при определенных условиях к нежелательным изменениям структуры волокон и их физико-механических свойств, процесс должен осуществляться при необходимом контроле и управлении степенью повреждения поверхности ткани. Это возможно при использовании (наряду с традиционными целлюлаз-

Тодосийчук Татьяна Сергеевна, Кокол Ваня, Дзыгун Лариса Петровна, Линовицкая Вита Михайловна.

Список сокращений: ГПДА — глюкозо-ПДА; КЖ — культуральная жидкость; КМЦ — карбоксиметилцеллюлоза; м.м. — молекулярная масса; ПААГ — полиакриламидный гель; ПДА — пептонно-дрожжевой агар; среда СА — среда сусло-агар.

* Автор для переписки.

ными комплексами) смесей кислых и нейтральных монокомпонентов. Установлено, что такие смеси целлюлаз поддаются эффективному контролю при финишной обработке ткани, однако для этого необходимо определение оптимальных условий их действия, включая температуру и кислотность среды.

Высшие ксилотрофные базидиальные грибы являются биообъектами, синтезирующими различные экзоферменты, в том числе целлюлазы, протеазы, оксидазы и др. [10—14]. Преимущества данной группы грибов заключаются в способности к деполимеризации целлюлозы с высоким уровнем упорядоченности, а также активной деградации лигно-целлюлозного комплекса.

Несмотря на наличие на мировом рынке разнообразных ферментных препаратов со сходной специфичностью работы по созданию технологий с использованием новых продуцентов целлюлаз остаются актуальными. Это обусловлено возможностью получения более активных, контролируемых и специфичных препаратов, а также разработки более рентабельных технологий их производства.

Целью представленного исследования был отбор перспективных продуцентов целлюлолитических препаратов на основании изучения их характеристик и результатов воздействия на целлюлозосодержащие материалы для применения в текстильной промышленности.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали культуры высших базидиальных грибов *Laetiporus sulphureus* (штаммы 306—308, 1518, 1772—1776) и *Schizophyllum commune* (штаммы 96, 97, 335, 441, 1590, 1713, 1714, 5009) из коллекции шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины [15].

Выращивание штаммов осуществляли при $28 \pm 1^\circ$ в чашках Петри на среде сусло-агара (СА) [16]. Глубинное культивирование проводили при $28 \pm 1^\circ$ в течение 7—12 сут на круговой качалке (180 об/мин) в колбах Эрленмейера (750 мл), содержащих 200 мл среды. Основой для сред был солевой раствор следующего состава, г/л: NH_4NO_3 — 3; KH_2PO_4 — 1; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 1,34; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; CuSO_4 — 0,003; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,005 [17] (все соли производства ООО “Химлаборреактив”, Украина, кроме $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Haifa Chemicals Ltd., Израиль) и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (НВП “Альфарус”, Украина)). Для получения посевного материала к солевой основе добавляли 20 г/л глюкозы (ООО “Химлаборреактив”) и 20 мл/л пивного сусла. На этапе биосинте-

за в качестве индуктора ферментов целлюлолитического комплекса в различные варианты сред вносили карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ, ООО “Химлаборреактив”) в концентрации 10%, фильтровальную бумагу (Spezialpapierfabrik Niederschlag, Германия), хлопчатобумажную (х/б) нить (Preta, Словения) либо пептон (2 %, ЗАО “Макрохим”, Украина). После биосинтеза биомассу отделяли фильтрованием через капроновый фильтр (ООО “Химлаборреактив”), а культуральный фильтрат использовали для определения активности ферментов, электрофоретического анализа, а также для обработки образцов текстильных материалов.

Для первичного анализа спектра ферментов на агаризованных средах использовали качественные цветные реакции [18]. Наличие целлюлазной активности определяли по образованию вокруг колоний прозрачных зон в пептоно-дрожжевом агаре (ПДА, ООО “Химлаборреактив”) с 5 г/дм^3 растворимой КМЦ, обработанной раствором конго красного (0,001% (Украина)), окрашивающего среду с нерасщепленной КМЦ в красный цвет. Казеинную активность выявляли по появлению прозрачных зон в глюкозо-пептоно-дрожжевом агаре (ГПДА) с казеином (10% (Fluka, Италия)), желатиназную — по прозрачным зонам в ГПДА с желатином (0,4 %, ООО “Химлаборреактив”) после обработки насыщенным раствором (75 %) сульфата аммония (ЗАО “Макрохим”).

Определение пероксидазы проводили нанесением капли реактива (1%-ный пирогаллол с 0,4%-ной перекисью водорода (1:1), ЗАО “Макрохим”) на край и в середину колонии при выращивании на СА [17]. При наличии пероксидазы появлялось морковно-красное или оранжево-коричневое окрашивание.

Активность (А) эндо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.4 эндо-1,4-β-D-глюканглюкогидролаза), мкмоль/ч/мл, анализировали при инкубации культурального фильтрата с 0,3%-ным раствором КМЦ в ацетатном буфере, pH 4,0, при 40° в течение 60 мин с последующим количественным определением образовавшихся продуктов гидролиза (редуцирующих сахаров) феррицианидным методом [19]. Концентрацию внеклеточных белков определяли методом Лоури.

Анализ белков культуральных фильтратов (сконцентрированных высаливанием 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) осуществляли методом вертикального электрофореза в 12,5%-ном ПААГ (Merck, Германия) при 10 мА и 100 В в течение 230 мин, используя блок питания Techware PS 252-2 (Sigma-Aldrich, Германия). В качестве маркеров при электрофорезе использовали α-лактальбумин (м.м. =

= 14,2 кДа); альбумин куриного яйца (м.м. = 45,0 кДа); карбоангидразу (м.м. = 29,0 кДа); бычий сывороточный альбумин (мономер — м.м. = 66,0 кДа и димер — м.м. = 132,0 кДа); уреазу (тример — м.м. = 272,0 кДа и гексамер — м.м. = 545,0 кДа) (Sigma MW-ND-500). После окончания процесса гелевую пластину окрашивали для проявления раствором амидового черного А-8181 (1% в 7%-ной уксусной кислоте) (Sigma) и отмывали в 7%-ной уксусной кислоте.

Специфическую активность ферментных комплексов исследуемых штаммов по отношению к целлюлозным волокнистым материалам определяли с использованием текстильных образцов 100%-ного хлопка с плотностью 275 г/см³ (Хлопок 1) и плотностью 222 г/см³ (Хлопок 2), а также комбинированного материала вискоза/хлопок/лайкра с плотностью 233 г/см³.

Образцы текстильных материалов (по 40 см²) обрабатывали культуральными фильтратами исследуемых штаммов и препаратами сравнения (см. далее) в различных условиях. При этом для поддержания рН=4,0, рН=5,0, рН=6,0 использовали цитратные буферные системы, а рН=7,0 — фосфатную [20]. Образцы погружали в раствор фермента и инкубировали на водяной бане в течение 60 мин при температуре 55°, после чего выдерживали 10 мин в дистиллированной воде при 95° для инактивации ферментов и отмывали в дистиллированной воде для удаления денатурировавших белков.

В качестве препаратов сравнения использовали целлюлазы (Novozymes A/S, Дания) с различными оптимумами активности: Denimax G[®] 361 S (700 ед/г, рН 6—7,5, 50—60°); Denimax G[®] 601 S (10000 ед/г, рН 6—7,5, 40—60°); Cellusoft G[®] -L (750 ед/г, рН 4,5—5,5, 40—55°) и Cellusoft G[®]-APL (750 ед/г, рН 4,5—5,5, 40—60°). Препараты применяли в виде 1%-ного раствора (базовая концентрация, рекомендованная производителем).

Анализ результатов обработки текстильных материалов осуществляли по уровню деградации целлюлозы, измеряя количество образовавшихся редуцирующих веществ в реакционной среде феррицианидным методом [19], а также по изменению физических характеристик образцов — массы (Δm), прочности на разрыв (F), удлинения (E) и белизны (W). Изменение массы определяли гравиметрическим методом как $\Delta m, \% = [(m_i - m_f) / m_i] \cdot 100$, где m_i , m_f — масса ткани до и после обработки. Прочность на разрыв и удлинение ткани в направлении деформации были определены согласно стандартам ISO (International Standard Organization) 5081 и ISO 13934-1 на динамометре Stategraph M (Textechno AG, Германия). Уровень белиз-

ны образцов определяли по коэффициенту отражения (при D65/10°) с использованием спектрофотометра Spectraflash SF 600 (Datacolor GmbH, Швейцария). Сканирующую электронную микроскопию образцов ткани осуществляли с использованием микроскопа Camridge S 360 (1000-кратное увеличение).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие ферментов разных классов при культивировании на агаризованных средах является как идентификационным признаком, так и критерием отбора штаммов для практического использования. Поэтому первым этапом работы было изучение спектра гидролитической и окислительной активности штаммов *S. commune* и *L. sulphureus*, известных высокой активностью соответствующих ферментов.

При качественном изучении ферментов разных классов у *S. commune* (табл. 1) было показано наличие протеолитической активности у всех штаммов. При этом интенсивные положительные реакции наблюдались у штаммов 441, 1714 и 5009 (казеиназа, желатиназа). Данные штаммы обладали также активной эндоглюканазой. Штаммы 96 и 97 в указанных условиях вообще не проявляли эндоглюканазной активности. Что касается окислительных ферментов, все штаммы обладали слабой пероксидазной активностью. Таким образом, при анализе спектра ферментов у исследуемых штаммов *S. commune* стали очевидны преимущества штамма 5009, синтезирующего все изученные ферменты.

Все штаммы *L. sulphureus* проявляли одинаковый уровень желатиназной активности, а в отношении других ферментов наблюдали большое штаммовое разнообразие. Так, наиболее выраженная целлюлазная активность зафиксирована у штаммов 1772, 1773 и 1774, а интенсивные положительные реакции на пероксидазу были отмечены у штаммов 1518 и 1776.

Таким образом, на основании спектров и интенсивности положительных ферментативных реакций на агаризованных средах для дальнейших исследований в глубинной культуре были выбраны штаммы *S. commune* 5009 и *L. sulphureus* 1774.

Основным предметом анализа на следующем этапе (в условиях глубинного культивирования) был выбран уровень активности целлюлаз, поскольку именно эти ферменты играют основную роль в процессах обработки текстильных материалов. Полученные результаты показали существенную разницу в активности целлюлолитических ферментов при выращивании штаммов на средах с различными субстратами-индукторами (рис. 1).

Таблица 1

Спектр ферментативной активности исследуемых штаммов *S. commune* и *L. sulphureus*

Штамм	Казеиназа	Желатиназа	Эндоглюканаза	Пероксидаза
<i>S. commune</i>				
96	+	++	-	±
97	+	++	-	±
335	++	++	++	±
441	+++	+++	+++	+
1590	++	+++	++	±
1713	+++	+++	++	±
1714	+++	+++	+++	±
5009	+++	+++	+++	+
<i>L. sulphureus</i>				
306	н/о	++	++	+
307	н/о	++	++	±
308	н/о	++	++	±
1518	н/о	++	++	++
1772	н/о	++	+++	+
1773	н/о	++	+++	±
1774	н/о	++	+++	+
1775	н/о	++	++	+
1776	н/о	++	+	+++

Примечание: "н/о" — не определяли; "-" — отсутствие реакции; "±" — слабая реакция; "+" — умеренный уровень активности; "++" — средний уровень активности; "+++ — высокий уровень активности.

Активность целлюлаз *S. commune* 5009 при выращивании на всех средах варьирует от 4,5 до 8,1 мкмоль/ч/мл в отличие от *L. sulphureus* 1774, активность которого составляет 0,9—6,2 мкмоль/ч/мл. В случае со штаммом 5009 очевидно положительное влияние субстратов на основе целлюлозы (фильтровальная бумага, х/б нить). Вариант среды с КМЦ значительно уступает по активности, а наличие пептона можно рассматривать скорее как фактор дополнительного питания, а не как стимулятор биосинтеза ферментов.

Иной эффект индукторов наблюдается при культивировании *L. sulphureus* 1774, что указывает на различия в специфичности синтезируемых ферментных комплексов у грибов разных видов. Так, максимальная активность целлюлаз наблюдается на среде с добавлением х/б нити и КМЦ; наличие в среде для *L. sulphureus* наряду с КМЦ пептона резко снижает активность целлюлаз данного гриба. Таким образом, сравнивая две исследуе-

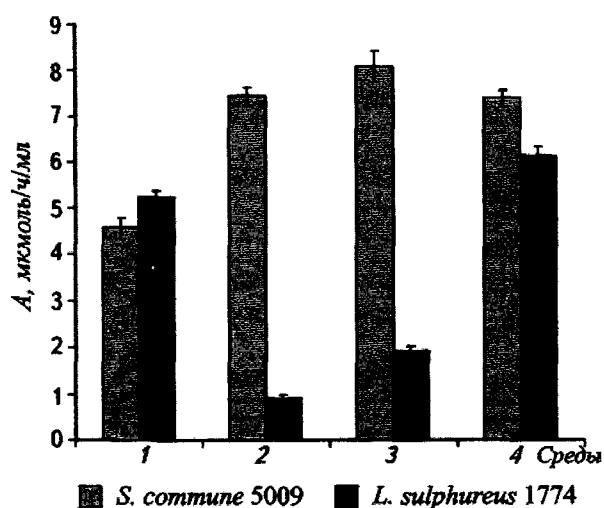


Рис. 1. Активность целлюлолитических ферментов (А) исследуемых штаммов при выращивании на средах, содержащих: 1 — КМЦ; 2 — КМЦ, пептон; 3 — фильтровальную бумагу; 4 — хлопчатобумажную нить

Таблица 2
Удельная целлюлазная (эндоглюканазная) активность нативных и концентрированных ферментных комплексов

Штамм	Удельная целлюлазная активность, ед/г белка	
	Фильтрат	Концентрат
<i>S. commune</i> 5009	39,88 ± 4,24	39,52 ± 3,38
<i>L. sulphureus</i> 1774	59,08 ± 6,28	105,87 ± 9,05

мые культуры, можно отметить, что биосинтез целлюлаз носит более выраженный индуцибельный характер у штамма *L. sulphureus* 1774.

Анализируя уровень и особенности синтеза ферментных комплексов штаммами на средах с различными индукторами, с целью накопления и последующего изучения синтезируемых ферментов для культивирования *S. commune* использовали среду с фильтровальной бумагой, а для *L. sulphureus* — среду с КМЦ. Выбор последней был обусловлен большей технологичностью использования КМЦ как компонента в производственной среде, чем х/б-нити, при близких значениях целлюлолитической активности.

Табл. 2 показывает результаты исследования удельной активности синтезируемых целлюлаз в исходных и сконцентрированных в 8 раз фильтратах КЖ штаммов *S. commune* и *L. sulphureus*. Отсутствие увеличения уровня удельной целлюлазной (эндоглюканазной) активности культу-

рального фильтрата *S. commune* при концентрировании может объясняться наличием в препарате других белков — возможно, ферментов другой специфичности или балластных белков [21, 22]. Синтезированный *L. sulphureus* ферментный комплекс в большей степени представлен именно целлюлазами, поскольку концентрирование фильтрата его КЖ приводит к почти двукратному увеличению удельной активности. Очевидно, степень увеличения удельной ферментативной активности не может в данном случае соответствовать степени концентрирования, поскольку фильтраты предварительно не были очищены.

Электрофорез в полиакриламидном геле концентрированных образцов культуральных фильтратов исследуемых штаммов (рис. 2) показал наличие в ферментном комплексе *S. commune* пяти белков (см. рис. 2, 7) с молекулярной массой 10—30 кДа, тогда как ферментный комплекс *L. sulphureus* содержал два белка с молекулярной массой приблизительно 10 и 30 кДа, но в более высокой концентрации (см. рис. 2, 8). Принимая во внимание данные о различной удельной целлюлазной активности концентрированных образцов, можно предположить, что не все из обнаруженных пяти белков в фильтрате *S. commune* являются ферментами или, по крайней мере, целлюлазами. Так, известно, что к белковым веществам, секретиремым данной культурой, например, относятся рецепторные белки гидрофобины (24 кДа) [21].

Полученные культуральные фильтраты использовали для обработки различных целлюлозо-содержащих текстильных материалов.

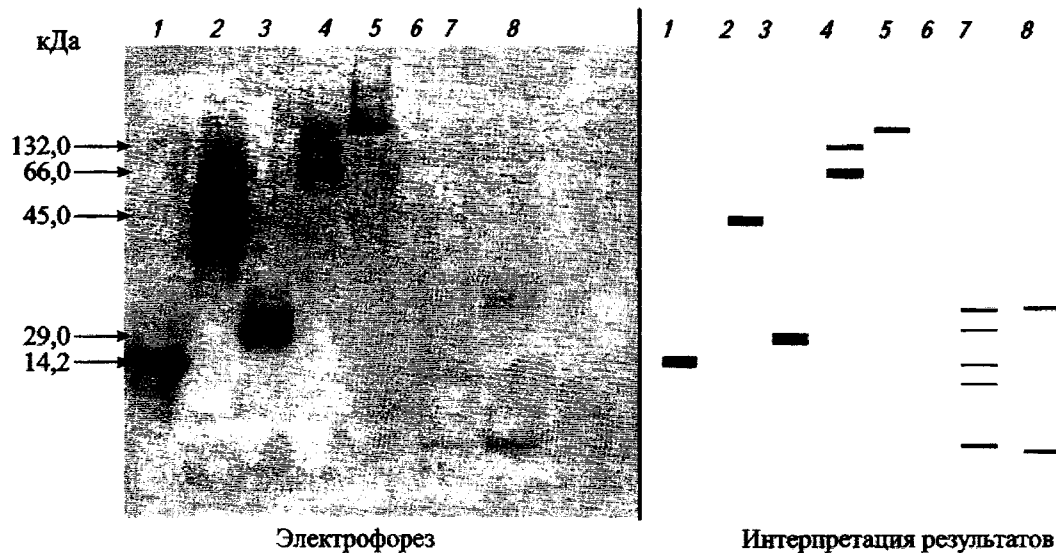


Рис. 2. Электрофорез концентрированных культуральных фильтратов *S. commune* (дорожка 7) и *L. sulphureus* (дорожка 8): дорожки 1—5 — маркеры молекулярной массы

Таблица 3

Уровень деградации текстильных материалов при использовании культуральных фильтратов исследуемых штаммов

Текстильный материал	<i>L. sulphureus</i> 1774		<i>S. commune</i> 5009	
	40°	50°	40°	50°
	Редуцирующие вещества, мкмоль/мл			
Вискоза/Хлопок/Лайкра	6,9±0,34	5,5±0,75	10,5±1,0	8,1±1,1
Хлопок 1	6,3±0,86	5,6±0,60	17,3±1,2	15,0±1,4
Хлопок 2	6,1±0,65	5,9±0,50	15,1±1,2	13,1±0,8

Степень деградации образцов текстиля после обработки фильтратами штаммов при pH 4,0 и различных температурах определяли по концентрации редуцирующих веществ, образовавшихся после расщепления целлюлозы в составе ткани (табл. 3).

Наиболее активная деградация волокон ткани ферментами *S. commune* наблюдалась при 40° и была на 6—10% выше, чем при температуре 50°.

Обработка образцов культуральным фильтратом *L. sulphureus* при 40° приводит к деградации всех видов ткани практически в одинаковой степени (6,1—6,9 мкмоль/мл редуцирующих сахаров). Это может свидетельствовать о более широкой специфичности данного ферментного комплекса по сравнению с комплексом *S. commune*, но одновременно меньшей его эффективности, поскольку уровень деградации образцов ткани последним составил 8,1—17,3 мкмоль/мл (см. табл. 3).

Анализ этих и ранее представленных данных с очевидностью указывает, что ферментный комплекс *S. commune* представлен ферментами разной специфичности, которые не проявляют значительную КМЦ-активность, но осуществляют заметную деградацию целлюлозы образцов ткани — возможно целлобиогидролазами, эндоглюканазами или β-глюкозидазами [22]. Это подтверждается значительно более высоким уровнем деградации образцов, состоящих только из хлопка (13,1—17,3 мкмоль/мл), по сравнению с количеством редуцирующих веществ при обработке образца, содержащего лайкру и вискозу (8,1—10,5 мкмоль/мл). Следует отметить также, что расщепление целлюлозы в более плотном образце хлопка (Хлопок 1) не только не было затруднено, как можно было ожидать, но было несколько эффективнее, чем в менее плотном образце (Хлопок 2). Следовательно, фактор плотности субстрата не влияет на эффективность деградации ткани, что позволяет применять такой способ для финишной обработки (полировки, шлифовки) текстиля различной плотности.

В соответствии с pH-оптимумами различают кислые и нейтральные целлюлазы [22, 23]. Для определения типа целлюлаз изучаемых культур, способных к гидролизу волокон исследуемых образцов ткани, и подбора оптимальных условий изучали влияние pH на их активность; ее определяли по уровню повышения концентрации редуцирующих сахаров в реакционной среде, образующихся в результате ферментативного гидролиза субстрата (КМЦ) после инкубации при 55° в течение 30 мин.

Представленные данные позволяют отнести ферментный комплекс *L. sulphureus* к кислым целлюлазам, тогда как *S. commune* синтезирует как кислые так и нейтральные ферменты, суммарное действие которых дает практически одинаковый эффект в диапазоне pH 5—7 (рис. 3). Более широкий pH-диапазон активности фермента определяет его преимущества при использовании в промышленных процессах.

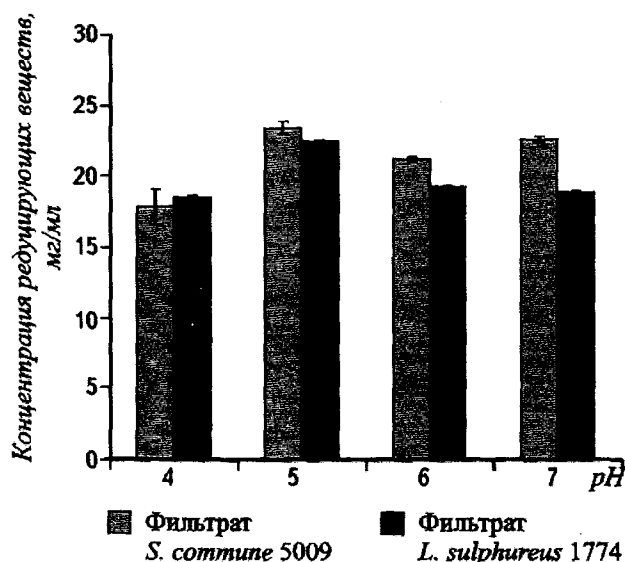


Рис. 3. Влияние pH на уровень деградации КМЦ ферментными комплексами исследуемых штаммов

Исходя из полученных данных, обработку образцов ткани для последующего анализа проводили фильтратами КЖ *L. sulphureus* 1774 и *S. commune* 5009 при 50с и рН=5 в течение 60 мин. Одновременно проводили обработку образцов ткани коммерческими препаратами сравнения (1%-ный раствор) в оптимальных для каждого условиях, приведенных в разделе «Условия эксперимента».

Представленные в табл. 4 результаты показывают, что образцы ткани, обработанные исследуемыми фильтратами и препаратами сравнения, по всем определяемым характеристикам имеют сравнимые величины. Так, уменьшение массы образцов хлопка меньшей плотности (Хлопок 2) находится в одном диапазоне значений при всех вариантах обработки, а более плотный образец (Хлопок 1) максимально (на 5,3 %) разрушается ферментами *S. commune*.

Прочность на разрыв (F) всех обработанных образцов также находится в одном диапазоне значений, максимально снижаясь по отношению к исходным значениям (814,0—827,6 Н) в образцах, обработанных промышленно используемыми целлюлазами (712,8—687,9 Н). При этом наибольшая белизна характеризует образцы после обработки фильтратом *L. sulphureus*, а обработанные ферментами *S. commune* образцы лишь незначительно

уступают по этому показателю препаратам сравнения.

Представленные данные свидетельствуют о сравнимых значениях эффективности исследуемых ферментных комплексов и контрольных ферментных препаратов. Следует отметить, что в промышленных процессах концентрацию используемых препаратов сравнения корректируют и оптимизируют в соответствии с типом обрабатываемых тканей. Поэтому, конечно, нельзя говорить об их одинаковой эффективности с исследуемыми ферментными комплексами; кроме того, изучаемые образцы использовали в виде культурального фильтрата, а не очищенных ферментных препаратов. Однако исходя из имеющихся данных, можно прогнозировать высокую активность исследуемых ферментов в виде готового очищенного продукта.

Полученные образцы ткани анализировали также с помощью сканирующей электронной микроскопии. На фото исходного образца Хлопка 1 (рис. 4, а) видны микроволоконца и неровности на поверхности отдельных волокон целлюлозы, которые полностью отсутствуют в образцах, обработанных исследуемыми ферментными комплексами (см. рис. 4, б, в); вместе с тем, в обработанных образцах отсутствуют видимые повреждения волокон целлюлозы.

Таблица 4

Физико-механические характеристики образцов ткани, обработанных исследуемыми ферментами и препаратами сравнения

Образец	Параметр*	Без обработки	Препараты сравнения				Фильтрат <i>L. sulphureus</i> 1774	Фильтрат <i>S. commune</i> 5009
			Den361S	Den601S	Cell-L	Cell-APL		
			рН 7		рН 5		рН 5	
Хлопок 1	Δm, %	—	-0,9	-1,7	-3,9	-3,2	-3,3	-5,3
	E, %	13,6	17,7	19,9	16,2	17,9	22,7	20,5
	F, Н	814,0	712,8	808,1	744,1	751,9	767,6	783,2
	W, усл. ед.	3,6	15,1	14,3	14,0	14,1	15,5	14,4
Хлопок 2	Δm, %	—	-2,0	-5,0	-4,0	-3,1	-3,7	-4,3
	E, %	10,6	14,5	15,1	13,4	14,6	18,5	16,2
	F, Н	827,6	687,9	739,5	800,3	775,4	806,6	789,1
	W, усл. ед.	3,4	15,0	13,4	13,5	13,9	17,1	10,5

* Δm — изменение массы; E — удлинение; F — прочность на разрыв; W — белизна.

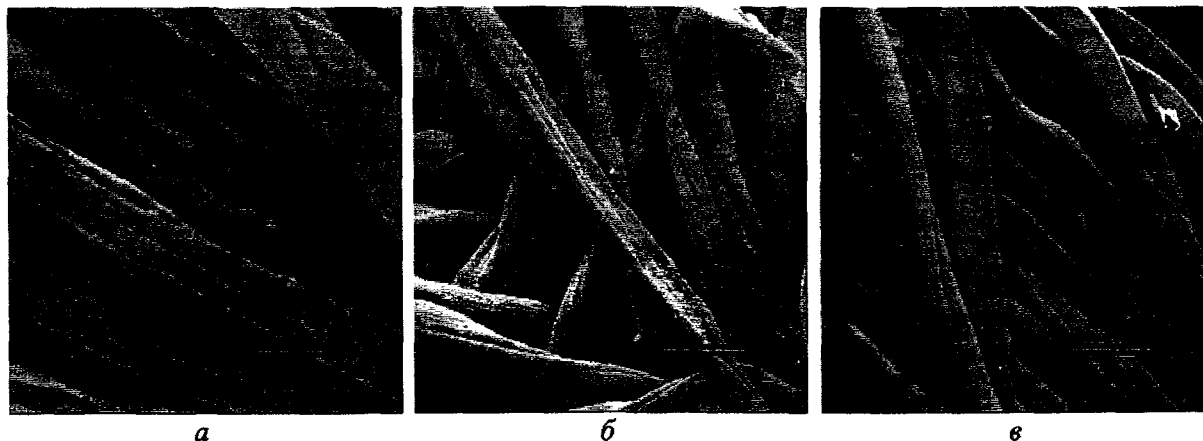


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия исходного (а) и обработанных филтратами *L. sulphureus* (б) и *S. commune* (в) образцов ткани. Масштабный отрезок равен 20 мкм (а) и 50 мкм (б и в)

Представленные результаты показывают возможное действие исследуемых микробных культур и целесообразность их селекции для получения промышленного продуцента ферментного препарата с целью его использования в производстве текстильных изделий. Преимуществами данных культур является возможность применения всего комплекса ферментов без выделения отдельных его компонентов (что дорого и сложно), а также его широкая специфичность. Анализ физико-механических свойств и данных микроскопии текстильных образцов, обработанных изучаемыми ферментными комплексами, дает основание предполагать эффективность использования последних в процессах производства тканей на этапах отбеливания, шлифовки и полировки.

Таким образом, отобраны новые штаммы *L. sulphureus* 1774 и *S. commune* 5009, синтезирующие ферментные комплексы (включающие гидролитические и окислительные ферменты), которые могут быть использованы в финишных процессах обработки текстильных изделий. Определено наличие у *S. commune* 5009 пяти белков с молекулярной массой от 10 до 30 кДа (включая предположительно целобιοгидролазу, эндоглюканазу или β-глюкозидазу), относящихся к кислым и нейтральным ферментам. Установлено, что ферментный комплекс штамма *L. sulphureus* 1774 содержит два белка с молекулярной массой 10 и 30 кДа, вероятно, представляющие собой кислые целлюлазы. Показано, что ферментные комплексы *L. sulphureus* 1774 и *S. commune* 5009 обладают высокой эффективностью при обработке текстильных материалов, что определяет перспективность использования отобранных штаммов в селекции высокоэффективного промышленного продуцента.

Работа выполнена в рамках Программы научного и технологического сотрудничества Словении и Украины (SLO-UKR 07/03-04) при поддержке Министерства образования, науки и спорта Словении и Министерства образования и науки Украины.

Получено 1.10.11

ЛИТЕРАТУРА

1. Hamlyn, P.F. The impact of Biotechnology in Textile Industry // Textile Magazine. — 1995. — V. 3. — P. 6—10.
2. Чешкова А.В. Технологии биохимического синтеза и модификации химических волокон // Химические волокна. — 2004. — № 6. — С. 37—40.
3. Чешкова А.В. Практические и теоретические аспекты печатания пигментами по биохимически подготовленным хлопчатобумажным тканям / А.В. Чешкова, О.В. Козлова, С.Л. Хомякова, А.С. Керев // Изв. вузов. Технология текстильной промышленности. — 2009. — № 1 (313). — С. 61—65.
4. Сеницын А.П. Возрастающая роль энзимных биотехнологий в отделке текстиля. Взгляд энзимолога и химика-технолога / А.П. Сеницын, Г.Е. Кричевский // Текстильная химия. — 2000. — Т. 18. — № 2. — С. 112—117.
5. Сафонов В.В. Влияние ферментов и аминокислот на крашение целлюлозных текстильных материалов водорастворимыми красителями / В.В. Сафонов, И.М. Шкурихин // Известия вузов. Технология текстильной промышленности. — 2001. — № 1. — С. 43—46.
6. Pawar, S.B. Enzymatic processing of cotton: A biotechnical approach / S.B. Pawar, H.D. Shar, G.R. Andhorikar // Man-Made Text. Ind. — 2002. — V. 45. — N. 4. — P. 133—138.
7. Miettinen-Oinonen, A. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH / A. Miettinen-Oinonen, J. Londesborough, V. Joutsjokib, R. Lanttoa, J.

- Vehmaanperäc // *Enzyme Microb. Techn.* — 2004. — V. 34. — N. 3—4. — P. 332—341.
8. *Miettinen-Oinonen, A.* The role of *Trichoderma reesei* cellulases in cotton finishing / A. Miettinen-Oinonen, L. Heikinheimo, J. Buchert, J. Morgado, L. Almeida, P. Ojapalo, A. Cavaco-Paulo // *AATCC Rev.* — 2001. — V. 1. — N. 1. — P. 33—35.
 9. *Ueda, M.* Cellulase treatment of cotton fabrics II: Inhibitory effect of surfactants on cellulase catalytic reaction / M. Ueda, H. Koo, T. Wakida, Y. Yoshimura // *Tetile Res. J.* — 1994. — V. 64. — N. 10. — P. 615—618.
 10. *Jae-Won, L.* Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi / L. Jae-Won, K. Ho-Yong, K. Bon-Wook // *J. Biosci. Bioeng.* — 2008. — V. 106. — N. 2. — P. 162—167.
 11. *Machuca, A.* Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium / A. Machuca, A. Ferraz // *Enz. Microb. Technol.* — 2001. — V. 29. — Issues 6—7. — P. 386—391.
 12. *Mi-Ri, H.* Purification and characterization of a thermostable β -1,3-1,4 Glucanase from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatius* / H. Mi-Ri, K. Yeong-Su, J. Ah-Reum, Jung-Kul Lee, Yeong-Suk Kim, Deok-Kun Oh // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2009. — V. 19. — N. 8. — P. 818—822.
 13. *Mtui, G.* Extracellular enzymes from brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus* isolated from mangrove forests of coastal Tanzania / G. Mtui, R. Masalu // *Sci. Res. Essay.* — 2008. — V. 3. — N. 4. — P. 154—161.
 14. *Kokol, V.* Screening of new microbial producers of enzymes for their use in textile finishing processes / V. Kokol, T. Todosiychuk, L. Dzygun, V. Linovytska // 3rd Int. Conf. on textile biotechnology INTB'04, Graz, University of technology, Austria, June 13—14. Book of abstracts. V. 1. — Graz: TUG, 2004. — P. 136.
 15. *Бухало А.С., Митропольська Н.Ю., Михайлова О.Б.* Каталог культур шапинкових грибів (ІВК). — Київ: Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного Національної Академії наук України, НВФ «Славутич-дельфін», 2006. — 36 с.
 16. *Методы экспериментальной микологии: Справочник* [под ред. В.И. Билай]. — Киев.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
 17. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. — Киев.: Наук. думка, 1988. — 144 с.
 18. *Molitoris, H.P.* Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi // *Czech. Mycology.* — 2000. — V. 52. — N. 2. — S. 97—124.
 19. Изделия кондитерские. Методы определения сахара ГОСТ 5903-89. [Введен 1991-01-01]. — М.: Государственный агропромышленный комитет СССР, 1989. — 23 с. (Межгосударственный стандарт).
 20. *Рабинович В.А., Хавин З.Я.* Краткий химический справочник. — Л.: Химия, 1977. — 379 с.
 21. *Martin, G.G.* Adsorption of a fungal hydrophobin onto surfaces as mediated by the associated polysaccharide sclzophyllan / G.G. Martin, G.C. Cannon, C.L. McCormick // *Biopolymers.* — 1999. — V. 49. — P. 621—633.
 22. *Reberdy, J.F., Chen, J.S., Taylor, C.H.* Enzyme secretion by fungi. GIAM 10: 10th Conf. Glob. Impacts Appl. Microbiol. and Biotechnol., Elsinore, 6—12 Aug, 1995. V. 1. — Elsinore, 1995. — P. 82.
 23. *Cavaco-Paulo, A.* Mechanism of cellulase action in textile processes. // *Carbohydr. Polym.* — 1998. — V. 37. — N. 3. — P. 273—277.
- T.S. TODOSIYCHUK¹, V.KOKOL², L.P. DZYGUN¹, and V.M. LINOVYTSKAYA^{1,*}
- ¹ The National Technical University of Ukraine, "Kiev Polytechnical Institute", 03056, Kiev Ukraine
- ² The University of Maribor, Faculty of Mechanical Engineering, Institute for Engineering Materials and Design, SI-2000, Maribor Slovenia
- e-mail: vmail@bigmir.net
vanja.kokol@uni-mb.si

Screening of Novel Producers of Cellulolytic Enzyme Complexes for Textile Processes

The results of screening of basidiomycetes with high-active cellulolytic complex are represented. The composition, specific activity and conditions for its manifesting in *Schizophyllum commune* 5009 and *Laetiporus sulphureus* 1774 strains were investigated. The enzymes were shown to belong to the acidic and neutral cellulases with the optimum activity at pH 5—7 and temperature 45—55°C. The efficiency of the above complexes in the final fabrics treatment was demonstrated.

Key words: biosynthesis, cellulases, enzyme complexes, *Laetiporus sulphureus*, *Schizophyllum commune*, textile processes.

* Author for correspondence.