УДК 582.287.238

ENZYMATIC ACTIVITY OF SOME SPECIES OF THE GENERA *COPRINELLUS* AND *COPRINOPSIS*

O. Kirpushko
National University of Food Technologies
M. Lomberg
N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine

Key words:
Enzymes
Enzymatic activity
Color tests

Article history:
Received 10.02.2013
Received in revised form 13.03.2013
Accepted 04.04.2013

Corresponding author:

E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The presence of certain enzymes characterizing the metabolism of carbohydrates (amylase, cellulase), proteins (protease), lipids (lipase), nitrogen compounds (nitrate reductase) and redox proceses (laccase) in the representatives of *Coprinopsis atramentaria*, *Coprinopsis cinerea* and *Coprinellus ephemerus* have been verified. The presence or absence of the activity of above mentioned enzymes in investigated strains by the methods of qualitative color tests have been determined.

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ОКРЕМИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДІВ *COPRINELLUS* ТА *COPRINOPSIS*

О.В. Кирпушко
Національний університет харчових технологій
М.Л. Ломберг
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ

У представників видів Coprinopsis atramentaria, Coprinopsis cinerea та Coprinellus ephemerus перевірено наявність певних ферментів, які характеризують метаболізм вуглеводів (амілаза, целюлаза), білків (протеаза), ліпідів (ліпаза), азотистих сполук (нітратредуктаза) та окисно-відновних процесів (лаказа). Методами якісних кольорових реакцій зазначено наявність чи відсутність ферментативної активності вище вказаних ензимів у досліджених штамів.

Ключові слова: *ензими, ферментативна активність, кольорові реакції.*

Щорічно спостерігається збільшення обсягів промислового культивування грибів, що пов'язано з їх функціональними перевагами, а також з наявністю у своєму складі біологічно активних речовин. Деякі з цих сполук були виявлені в фенольних, полісахаридних, ліпідних та інших фракціях окремих представників їстівних і неїстівних видів грибів [2].

Результати нещодавніх досліджень [4, 6] показують значний потенціал грибів роду *Coprinus sensu lato* щодо інгібування росту різних ліній ракових клітин, та виділення з них сполук різноманітної хімічної природи з протигрибковими, антибактеріальними та інсектицидними властивостями.

Целюлоза, геміцелюлоза та лігнін є основними компонентами лігноцелюлозної біомаси. Багато грибів деградують целюлозу та геміцелюлозу за допомогою позаклітинних гідролітичних ферментів. У копринусів, що ростуть як сапротрофи на залишках деревини, на лісовій підстилці, на старому компості, зацікавленість являють такі ензими як целюлази, пероксидази, лакази, за допомогою яких гриби розкладають та засвоюють клітковину. Целюлази гідролізують β-1,4-глікозидні зв'язки целюлози та класифікуються як ендоглюконази або целобіогідролази. Ендоглюконази випадковим чином розщеплюють внутрішні β-1,4-глікозидні зв'язки целюлози, в той час як целобіогідролази переважно діють на кінці ланцюга і поступово відщеплюють целобіозу як основний продукт, котрий далі гідролізується β-глюкозидазою до глюкози [4]. Лігніншероксигенази — ферменти, що мають ключову роль в лігнінолітичному циклі, що відповідальний за деградацію комплексного полімеру лігніну. Лаказа широко розповсюджений фермент серед дереворуйнівних грибів, котрий також пов'язаний з деградацією лігніну. Самостійно, чи разом з іншими ферментами, лаказа деполімеризує макромолекулу лігніну. Біологічне перетворення деревини є одним з перспективних напрямків використання лігнінлітичних грибів [1, 7]. Ензими з вищих грибів викликають значний інтерес в зв'язку з їх можливим промисловим та екологічним використанням. На сьогоднішній день дослідники розглядають лігноцелюлозу як альтернативне джерело вуглецю для палива та хімічного виробництва саме через його величезну кількість в природі [3].

Метою даної роботи було встановлення наявності певної ферментативної активності у окремих представників родів *Coprinopsis* та *Coprinellus*.

Об'єктами досліджень були чисті культури видів *Coprinopsis atramentaria*, *Coprinopsis cinerea* та *Coprinellus ephemerus*, роду *Coprinopsis* та *Coprinellus*, родини *Psathyrellaceae*, порядку *Agaricales*, вищих *Agaricomycetes*, які зберігаються в Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІВК). Загалом в дослідженнях були використані 6 штамів різного географічного походження: *Coprinellus ephemerus* — 8, 49, 245; *Coprinopsis cinerea* — 200, 262; та *Coprinopsis atramentaria* — 1946. Для визначення ензиматичної активності використовували методи якісних кольорових ферментативних реакцій, зазначені у праці Х. П. Моліторіса [5].

Для проведення тестів використовували чашки Петрі та пробірки з ГПДА (глюкозо-картопляно-декстрозний агар) та ПДА (картопляно-декстрозний агар). Лаказну, протеазну, целюлазну та амілазну активність визначали з використанням чашок Петрі, ліпазну та нітрат-редуктазну активність під час вирощування культур в пробірках з відповідним складом поживних середовищ [5].

Було досліджено біологічну активність 6 ензимів, що характеризують окисно-відновні процеси (лаказа) , метаболізм вуглеводів (амілаза, целюлаза), ліпідів (ліпаза), білків (протеаза) та азотистих сполук (нітратредуктаза). Згідно з сучасної класифікації ферментів дані ензими відносяться до трьох класів, зокрема лаказа до оксидаз, нітратредуктаза — до класу оксидоредуктаз, амілаза, целюлаза, ліпаза та протеаза — ферменти класу гідролаз.

Дослідження наявності лаказної активності проводили на середовищі: 1000 мл ГПДА + + 0,05 г α-нафтолу, значення pH 6,0. Позитивна реакція виявлялася в появі синьо-фіолетового забарвлення у середовищі внаслідок окиснення безбарвного α-нафтолу лаказою.

При визначенні амілазної активності використовували поживне середовище: 900 мл ГПДА + 100 мл розчину крохмалю (2 г крохмалю в 100 мл), значення pH 6,0. Позитивна реакція на амілазу визначалася за наявністю безбарвних зон навколо колонії, що росте або під нею після додавання 3%-го розчину Люголя, негативній реакції відповідало фіолетове забарвлення середовища.

При встановленні наявності целюлазної активності використовували середовище ПДА до якого додавали 5 г розчинної карбоксиметилцелюлози (КМЦ), значення pH 7,0. Наявність КМЦ-активності визначали за утворенням прозорих зон біля або під колоніями грибів після обробки середовища розчином конго-червоного (0,001 %), який зафарбовував середовище у червоний колір.

При дослідженні протеазної активності готували поживне середовище, що складалося з двох розчинів: розчин А — 900 мл ГПДА, розчин Б — 6 г желатину розчиняли в 100 мл води. Розчини А і Б стерилізували окремо, охолоджували до 45 °С та змішували. Наявність активності протеази підтверджувала поява прозорих зон навколо колонії гриба або під нею через 3 год або на наступну добу культивування.

Визначення наявності ліпазної активності проводили на пробірках з незкошеним агаром, використовуючи наступне середовище: 1000 мл ГПДА + 0,5 г $CaCl_2$ та 10 мл Tween 80, значення pH 6,0. Позитивна реакція на ліпазу виявлялася в результаті утворення осаду омилених сполук у середовищі з Tween 80 із хлоридом кальцію ($CaCl_2$) навколо або під колонією досліджуваних штамів грибів.

Наявність нітратредуктазної активності встановлювали з використанням даного поживного середовища: 1000 мл ГПДА + 15 г $NaNO_3$, значення pH 7,4. Контроль — ГПДА. Принцип: нітрат під час дії нітратредуктази перетворюється на нітрит, при додаванні розчинів сульфанілової кислоти та α-нафтиламіну утворюється яскраво-рожева сполука. Розчин А: 0,5 г сульфанілової кислоти розчиняли в 150 мл оцтової кислоти. Розчин Б: 0,1 г α-нафтиламіну розчиняли в 20 мл дистильованої води й доводили до 150 мл 5 н оцтовою кислотою. У пробірки з колоніями грибів на 3добу росту додавали по 0,2 мл розчину А і Б й та спостерігали за зміною забарвлення, його інтенсивність порівнювали з контролем.

Результати проведеного дослідження наявності різної ферментативної активності у окремих представників родів *Coprinopsis* та *Coprinellus* представлено у таблиці 1.

Таблиця 1. **Загальні наслідки тестування ферментативної активності у культур з родів *Coprinopsis* та *Coprinellus***

№	Вид	Штам ІВК	Лаказа	Амілаза	КМЦ-целюлаза	Ліпаза	Протеаза	Нітратредукта-за
1	*Coprinopsis atramentaria*	1946	+	-	-	-	-	4+
2	*Coprinopsis cinerea*	200	2+	4+	4+	4+	-	±
3	*Coprinopsis cinerea*	262	4+	+	4+	4+	-	-
4	*Coprinellus ephemerus*	8	2+	3+	4+	-	-	-
5	*Coprinellus ephemerus*	49	4+	3+	4+	-	-	±
6	*Coprinellus ephemerus*	245	4+	4+	3+	-	-	-

П р и м і т к а. Інтенсивність ензиматичних реакцій: 4+ сильна позитивна реакція на 3 добу культивування; 3+ сильна позитивна реакція на 15 добу; 2+ помірна реакція; ± дуже слабка реакція; — реакція відсутня.

Лаказа — мідь-вмісний фермент, котрий каталізує окиснення фенолів. У всіх досліджених штамів була відмічена позитивна реакція на лаказу від сильної — на 3 добу культивування, як у *C. ephemerus* 49, 245 та *C. cinerea* 262 до слабкої у *C. atramentaria* 1946 (табл. 1). Тобто, досліджені штами показали різні за інтенсивністю позитивні реакції (від сильної до слабкої на 3 – 15 добу культивування), що свідчить про різноманітну лаказну активність. Таким чином вони здатні окиснювати молекулярним киснем орто- та пара- дифеноли, моно-, три- та поліфеноли з утворенням відповідних хінонів.

Амілаза — це фермент, котрий гідролітично розщеплює крохмаль та глікоген з утворенням декстринів, мальтози та глюкози. В результаті проведених дослідів було встановлено, що всі досліджені штами, крім *C. atramentaria* 1946, показали різноманітну амілазну активность. У штамів *C. ephemerus* 245 та *C. cinerea* 200 спостерігалась сильна позитивна реакція на 3 добу культивування, в той час як у штамів *C. ephemerus* 8 та 49 на 15 добу культивування. Лише у штаму *C. cinerea* 262 відмічена слабка амілазна активність, та у *C. atramentaria* 1946 реакція на амілазу виявилася негативною. Отримані позитивні реакції свідчать про здатність досліджених штамів гідролітично розщеплювати крохмаль до більш простих сполук.

Целюлаза, а в нашому випадку ми мали справу з карбоксиметилцелюлазою (КМЦ) — фермент, що каталізує гідроліз глікозидних зв'язків в целюлозі з утворенням глюкози чи дисахариду целобіози. В даному досліджені було виявлено, що всі штами, окрім *C. atramentaria* 1946, показали високу целюлазну активність, оскільки спостерігалась позитивна реакція на КМЦ, причому з віком вона ставала більш виразною. У всіх досліджених штамів, окрім *C. ephemerus* 245, була відмічена сильна позитивна реакція на 3 добу культивування, в той час як у даного штаму така позитивна реакція спостерігалася на 15 добу. В результаті отриманих даних, можна зробити висновок, що окремі представники родів *Coprinopsis* та *Coprinellus* здатні розкладати целюлозу до глюкози чи дисахариду целобіози.

Ліпаза — ліполітичний фермент, котрий каталізує гідроліз складно-ефірних зв'язків в тригліцеридах з утворенням жирних кислот та гліцерину. В результаті проведеного у більшості досліджених видів і штамів *C. ephemerus* 8, 49, 245 та *C. atramentaria* 1946 ліпазну активність не виявлено. Про це свідчило те, що в процесі росту даних штамів не відбувалося утворення осаду омилених сполук. Тобто, дані штами не підтвердили здатність гідролізувати тригліцериди до вищих жирних кислот та гліцерину. Натомість, штами виду *C. cinerea* 200 та 262 показали сильну позитивну реакцію вже на 3 добу культивування. Таким чином дані штами можуть здійснювати гідроліз тригліцеридів до більш простих сполук.

Протеаза — протеолітичний фермент, котрий розщеплює пептидний зв'язок між амінокислотами в білках. Дослідження протезної активності проводили з використанням желатину в якості білку. При вирощуванні чистих культур грибів на середовищі, що містило желатин, всі досліджені штами показали негативну реакцію на ензим протеазу. Таким чином, можна стверджувати, що всі досліджені штами не здатні гідролізувати пептидні зв'язки, оскільки протезна активність у них відсутня.

Нітратредуктаза — молібденвмістний ензим, що каталізує відновлення нітратів до нітритів в процесі асиміляції нітрату. Дослідження наявності нітратредуктазної активності проводили з використанням $NaNO_3$ в якості джерела азоту. Встановлено, що лише штам *C. atramentaria* 1946 показав високу нітратредуктазну активність, що проявилася у зміні забарвлення середовища на яскраво-рожевий колір вже через 10 хвилин після внесення відповідних реактивів. У досліджених штамів *C. ephemerus* 8 та *C. cinerea* 200 спостерігалася незначна зміна забарвлення середовища на наступну добу, яка може бути трактована як вкрай слабка ферментативну активність щодо нітратредуктази. Інші досліджені штами не виявили нітратредуктазної активності, тобто цілком ймовірно, що вони не здатні до асиміляції нітратів.

Висновки

Досліджено ферментативну активність (ензими лаказа, ліпаза, КМЦ-целюлаза, амілаза, протеаза та нітратредуктаза) у окремих представників грибів родини *Psathyrellaceae*. Реакція на лаказу за допомогою чутливого тесту з α-нафтолом у всіз досліджених штамів виявилася позитивною. Нітратредуктазна активність переконливо спостерігалася лише у *C. atramentaria* 1946. Встановлено, що протезна активність у всіх досліджених штамів була відсутня. У всіх досліджених штамів, окрім *C. cinerea* 200 та 262, реакція на ліпазу виявилася також негативною. Можливо, реакція на ліпазу для виду

C. cinerea може стати одним з таксономічних критеріїв для ідентифікації культури у вегетативній стадії розвитку, але це потребує подальшого дослідження більшої кількості штамів даного виду. Щодо інших ферментів, у досліджених штамів *C. ephemerus* та *C. cinerea* була відмічена різноманітна позитивна реакція на амілазу та целюлазу (від сильної до слабкої на 3 — 15 добу культивування).

Література

1. *Hatakka A., Hammel K.* Fungal biodegradation of lignocelluloses // − Industrial Applications the Mycota. — 2010. — Vol. 10. — P. 319 – 340.

2. *Heleno SA, Barros L, Martins A, Queiroz MJ, Santos-Buelga C, Ferreira IC.* Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern Portugal: chemical compounds with antioxidant properties // J Agric Food Chem. — 2012. − Vol. 60 (18). — P. 4634 − 4640.

3. *Jovanovic I., Magnuson J.K., Collart Fr., Robbertse B., Adney W.S., Himmel M. E., Baker S. E.* Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies // Cellulose. — 2009. − Vol. 16, № 4. — P. 687 – 697.

4. *Kurakata Y., Tonozuka T., Liu Y., Kaneko S., Nishikawa A., Fukuda K., Yoshida M.* Heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray characterization of CcCel6C, a glycoside hydrolase family 6 enzyme from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea* // Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. — 2009. — Vol. 65, № 2. — P. 140 – 143.

5. *Molitoris H.P.* Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi // Czech mycol. — 2000. — Vol. 52, № 2. — P. 17 – 24.

6. *Pettita G. R., Menga Y., Pettita R.K., Heralda D. L., Hogana F., Cichacza Zb. A.* Antineoplastic agents 582. isolation and structure of a cyclobutane-type sesquiterpene cancer cell growth inhibitor from *Coprinus cinereus* (*Coprinaceae*) // Bioorg Med Chem. — 2010. − Vol. 18 (14). — P. 4879 – 4883.

7. *Smith A.T., Doyle W.A., Dorlet P., Ivancich A.* Spectroscopic evidence for an engineered catalytically active Trp radical that create the unique reactivity of lignin peroxidas // Proc Natl Acad Sci USA. — 2009. − Vol. 106, № 38. — P. 16084 – 16089.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ COPRINELLUS И COPRINOPSIS

О.В. Кирпушко
Национальный университет пищевых технологий
М.Л. Ломберг
Институт ботаники им. М.Г. Холодного НАН Украины

У представителей видов Coprinopsis atramentaria, Coprinopsis cinerea и Coprinellus ephemerus проверено наличие определенных ферментов, характеризующих метаболизм углеводов (амилаза, целлюлаза), белков (протеаза), липидов (липаза), азотистых соединений (нитратредуктаза) и окислительно-восстановительных процессов (лакказа). Методами качественных цветных реакций отмечено наличие или отсутствие ферментативной активности выше указанных ферментов у исследованных штаммов.

***Ключевые слова**: энзимы, ферментативная активность, цветные реакции.*