

О. В. Федотов, Т. Є. Волошко

**ВПЛИВ НІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ НА ПЕРОКСИДАЗНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ
ЇСТІВНИХ ЛІКАРСЬКИХ БАЗИДІОМІЦЕТІВ *PLEUROTUS OSTREATUS*
(JACQ. EX FR.) KUMM. ТА *LENTINUS EDODES* (BERK.) SING.**

Донецький національний університет; 83050, м. Донецьк, вул. Щорса, 46

e-mail: fedotov@dongu.donetsk.ua

Федотов О. В., Волошко Т. Є. Вплив нікотинової кислоти на пероксидазну активність штамів їстівних лікарських базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. та *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. – Розглянуто результати культивування штамів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinus edodes* на живильних середовищах з нікотинової кислотою у різних концентраціях, що дозволяють оптимізувати середовище з метою індукції біосинтезу ферменту пероксидази.

Ключові слова: їстівні лікарські базидіоміцети, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, пероксидаза, нікотинова кислота.

Вступ

Ксилотрофні базидіоміцети займають важливе місце в структурі біоценозів, оскільки наявний ферментативний комплекс дозволяє їм повністю розщеплювати всі компоненти деревини. Ця якість дереворуйнівних грибів робить їх перспективними об'єктами біотехнології багатьох природних біологічно активних речовин (БАР) [11, 16]. Джерелом БАР, а також і ферментів, можуть бути не лише плодові тіла, а й міцеліальна біомаса та культуральний фільтрат, які отримують сучасними біотехнологічними методами культивування грибів [2, 4].

Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm. – глива звичайна містить у міцелії більше 30% білка, майже всі незамінні амінокислоти, полісахариди, вітаміни. Відомі антибіотичні, протипухлинні, радіопротекторні та інші лікарські властивості цього гриба. *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. – сїїтаке виявляє антибактеріальні, антивірусні, протипухлинні, імуномодуючі, тромболітичні властивості [2]. Таким чином, ксилотрофи *Pleurotus ostreatus* та *Lentinus edodes* викликають інтерес для медицини, грибовництва, фармакологічної і харчової промисловостей.

Відомо, що несприятливі умови життєдіяльності спричиняють розширення пластичності функцій та властивостей усіх основних метаболічних систем макроміцетів. Адаптаційні перебудови, насамперед, стосуються ферментативних систем, вони призводять до утворення ферментів, здатних активно функціонувати за дії несприятливих факторів. Одним із таких надзвичайно функціонально лабільних ферментів, що реагує на порушення гомеостазу клітинного метаболізму при дії різноманітних стресорів, є пероксидаза (КФ 1.11.1.7). Слід зазначити, що біосинтез та властивості грибних пероксидаз майже не вивчені, а літературні дані стосуються таких ферментів рослинного, тваринного та мікробного походження. Відзначаються зміни як у наборі молекулярних форм ферменту, так і в їх активності за дії біотичних та абіотичних чинників [10]. Отже, вивчення синтезу й індукція пероксидазної активності грибів є актуальними питаннями мікології та біотехнології.

Дослідження показали, що спостерігається вірогідне збільшення пероксидазної активності (ПА) клітин картоплі при патогенезі *Clavibacter michiganensis sepedonicus* (Cms.), яке зумовлене підвищенням кількості активних форм кисню у відповідь на інфікування рослин [3]; зафіксовано підвищення активності пероксидази в паростках сосни звичайної при інфікуванні *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. [6], озимих зернових під час водного дефіциту, при механічних ушкодженнях, у процесі старіння та за дії високої температури [5, 7, 12].

Встановлено, що загальною реакцією-відповіддю рослинного організму на дію несприятливих факторів довкілля, таких як спека, водний дефіцит [17], засолення, холод, надлишкове світло [1, 14], поранення [15], озон [19], ультрафіолетове опромінення та інфекції патогенів [13, 18], є посилене утворення та накопичення активних форм кисню, що відіграє подвійну роль – з одного боку, вони є високотоксичними інтермедіантами, з іншого

– регуляторами метаболічних процесів і захисних реакцій [17]. У відповідь на дію стресорів, що проявляються у вигляді збільшення загальної кількості активних форм кисню, спостерігається значне підвищення пероксидазної активності [13, 19]. Вплив хімічних речовин на пероксидазну активність, що виступають субстратом для пероксидази є малодослідженим [8].

Метою нашої роботи було вивчення росту й активності пероксидази штамів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinus edodes* при додаванні в культуральну рідину нікотинової кислоти в концентраціях 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 мкМоль/л за 24 год. до визначення пероксидазної активності. Концентрації нікотинової кислоти в культуральній рідині та час визначення ПА обрано згідно з попередніми дослідженнями, що показали відсутність вірогідного впливу на ПА цих штамів концентрацій нижче 0,5 мкМоль/л, та її пригнічення при концентраціях вище 10,0 мкМоль/л на 24 годину після внесення вітаміну.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктами дослідження були штам Р-191 *Pleurotus ostreatus* та штам Le-340 *Lentinus edodes*.

З метою визначення динаміки накопичення біомаси та зміни активності пероксидази штами культивували в колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл на стерильному глюкозо-пептонному середовищі об'ємом 50 мл ($pH_0 = 6,25$) наступного складу, г/л: глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 0,6; K_2HPO_4 – 0,4; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; $CaCl_2$ – 0,05; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001; дистильована вода – до 1 л.

Культивування проводили при оптимальній для синтезу пероксидази температурі 27,5°C, протягом 20 діб. Визначення показників росту: рН культурального фільтрату (КФ) на рН-метрі, накопичення біомаси ваговим методом [4] та активності пероксидази в міцелії і КФ проводили через кожні 5 діб ферментації.

Пероксидазну активність визначали за методом, який базується на фотоелектроколориметричному вимірі інтенсивності забарвлення продукту окислення о-діанізидину перекисом водню. Одиниця пероксидази відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 мкМоля H_2O_2 за одну хвилину в оптимальних умовах. Розрахунки проводили за формулою [4]

$$X = \frac{E \cdot V_1}{E_1 \cdot K \cdot V_2 \cdot t} \cdot p, \quad (1)$$

де X – активність ферменту пероксидази; E – екстинкція; V_1 – об'єм забарвленої проби; V_2 – об'єм гомогенату міцелію (МГ) або культурального фільтрату (КФ); E_1 – коефіцієнт мікромолярної екстинкції (0,0128); K – коефіцієнт для перерахунку з мілілітрів у літри (1000); t – час інкубації (5 хв.); p – розведення.

Отримані експериментальні дані обробляли за допомогою дисперсійного аналізу, порівняння середніх арифметичних проводили за методом Дункана [9].

Результати та їх обговорення

Дані динаміки росту та пероксидазної активності штаму Р-191 наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Динаміка росту та пероксидазної активності штаму Р-191 *Pleurotus ostreatus*

Вік культури, доба	Біомаса, г/л	рН КФ	Активність пероксидази, 10^{-2} ум. од.	
			МГ	КФ
5	$0,22 \pm 0,21$	6,22	$1,27 \pm 0,15$	$0,86 \pm 0,09$
10	$1,48 \pm 0,74$	6,34	$5,03 \pm 0,83$	$3,54 \pm 0,47$
15	$2,69 \pm 0,43$	6,41	$6,56 \pm 0,05$	$3,18 \pm 0,55$
20	$3,76 \pm 0,49$	6,37	$6,14 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,34$

Пероксидазна активність штаму Р-191 має максимум для міцелію на 15-ту добу культивування та на 10-15-ту для КФ. Пероксидазна активність міцелію штаму Р-191 перевищує таку активність культурального фільтрату. рН КФ має найвище значення 6,41 на 15-ту добу ферментації, що співпадає з максимумом ПА.

Дані динаміки росту та пероксидазної активності штаму Le-340 наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Динамика росту та пероксидазної активності штаму Le-340 *Lentinus edodes*

Вік культури, доба	Біомаса, г/ л	рН КФ	Активність пероксидази, 10 ⁻² ум. од.	
			МГ	КФ
5	0,10 ± 0,04	6,06	0,64 ± 0,09	0,49 ± 0,09
10	0,22 ± 0,04	6,18	2,53 ± 0,17	1,53 ± 0,31
15	0,29 ± 0,03	6,33	5,21 ± 0,36	1,89 ± 0,24
20	0,35 ± 0,25	6,17	4,50 ± 0,04	0,85 ± 0,08

Пероксидазна активність штаму Le-340 підвищується з часом культивування: максимуму набуває на 15-ту добу ферментації. ПА міцелію, як і у попередньому випадку перевищує ПА культурального фільтрату.

Для вивчення впливу ніотинової кислоти на пероксидазну активність штамів Р-191 та Le-340, їх культивували на глюкозо-пептонному середовищі 15 діб. За 24 год. до визначення ПА, у культуральну рідину додавали розчин вітаміну РР у кінцевих концентраціях: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 мкМоль/л. Результати дослідів наведено в табл. 3.

Таблиця 3

Вплив ніотинової кислоти на пероксидазну активність штамів їстівних лікарських базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinus edodes*

Концентрація вітаміну РР, мкМоль/л	Активність пероксидази, 10 ⁻² ум. од.	
	МГ	КФ
Штам Р-191 <i>Pleurotus ostreatus</i>		
0,5	11,24 ± 0,41	4,07 ± 0,18
1	6,81 ± 0,22	2,03 ± 0,13
5	10,33 ± 0,61	3,67 ± 0,39
10	8,53 ± 0,67	2,78 ± 0,32
0, контроль	6,56 ± 0,05	3,18 ± 0,55
Штам Le-340 <i>Lentinus edodes</i>		
0,5	18,33 ± 0,75	8,33 ± 0,48
1	9,17 ± 0,41	5,73 ± 0,63
5	8,02 ± 0,63	5,73 ± 0,41
10	12,08 ± 0,64	9,06 ± 0,63
0, контроль	5,21 ± 0,36	1,89 ± 0,24

Аналіз даних табл. 3, свідчить про те, що активність пероксидази в міцелії та культуральному фільтраті штаму Р-191 *Pleurotus ostreatus* і штаму Le-340 *Lentinula edodes* змінюється під впливом вітаміну РР. Додавання ніотинової кислоти до культуральної рідини через 24 год. спричиняє збільшення пероксидазної активності порівняно з контролем. Спостерігаються два піки максимальної активності ферменту, що відповідають концентраціям вітаміну РР 0,5 і 10,0 мкМоль/л для штаму Le-340; та 0,5 і 5,0 мкМоль/л – штаму Р-191.

Висновки

Пероксидазна активність досліджених штамів базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinus edodes* змінюється під впливом нікотинової кислоти. Вірогідне максимальне збільшення активності пероксидази штаму Le-340 спостерігається при концентрації вітаміну PP 0,5 і 10,0 мкМоль/л у живильному середовищі за 24 год. до визначення ПА; та 0,5 і 5,0 мкМоль/л – штаму P-191.

Список літератури

1. Бедулина Д. С., Шатилина Ж. М. Ингибирование пероксидазы при интоксикации солями кадмия // Вестник РГМУ. – 2005. – №3 (42). – С. 156.
2. Бухало А. С., Соломко Е. Ф., Митропольская Н. Ю. Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями // Укр. ботан. журн. – 1996. – 53, № 3. – С. 192-201.
3. Граскова И. А., Владимірова С. В., Колесниченко А. В. Изменение активности пероксидазы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біол. – 2002. – № 9 (1). – С. 37-44.
4. Дудка И. А., Вассер С. П., Элланская И. А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
5. Капустян А. В., Кучеренко В. П., Панюта О. О., Мусієнко М. М. Активність пероксидази та зміна її ізоферментних форм за умов низькотемпературного стресу // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т. 36, № 1. – С. 55-63.
6. Кудінова О. В., Бойко М. І. Активність пероксидази в паростках сосни звичайної, уражених *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (коренева губка) // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя, 2001. – Вип. 6, № 2. – С. 83-88.
7. Кучеренко В. П., Капустян А. В., Шередєко Л. М., Мусієнко М. М. Спосіб прогнозування зимостійкості озимих зернових // Деклараційний патент на винахід № 32911 А. Опубл. 15.02.2001. – Бюл. № 1.
8. Макович О. М., Михайлова Р. В., Лобанок А. Г., Чихаєва О. В. Влияние эффекторов на биосинтез внеклеточной пероксидазы *Phellinus robustus* K. // Тез. докл. II съезда микологов России "Современная микология в России". – М., 2008. – С. 133.
9. Присєдський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Кассіопея, 1999. – 210 с.
10. Савич И. М. Пероксидазы – стрессовые белки растений // Усп. совр. биол. – 1989. – Т. 107, вып. 3. – С. 406-417.
11. Соломко Э. Ф., Дудка И. А. Перспективы использования высших базидиомицетов в микробиологической промышленности // ВНИСЭТИ: Обзорная информация. Сер. 3. – М., 1985. – 48 с.
12. Таран Н. Ю., Оканенко О. А., Бацманова Л. М., Мусієнко М. М. Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т. 36, № 1. – С. 3-14.
13. Тарчевский И. А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие // Физиол. раст. – 2000. – 47, № 2. – С. 321-331.
14. Behera R. K., Choudhuri N. K. High irradiance induced pigment degradation and loss of photochemical activity of wheat chloroplasts // Biol. plant. – 2002. – P. 45-49.
15. Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W. Defence activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco // PNAS. – 1998. – 95, № 5. – P. 5818-5823.
16. Eriksson K.-E., Blanchette R. A., Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.
17. Foyer C. H., Descourvieres P., Kunert K. J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants // Plant Cell Environ. – 1994. – 17, № 2. – P. 507-523.
18. Lamb C., Dixon R. A. The oxidative burst in plant disease resistance // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. – 1997. – 48. – P. 251-275.

19. *Sakaki T.* Photochemical oxidants: toxicity // Responses of plant metabolism to air pollution and global change / Eds. L. J. De Kok, J. Stolen. – Leiden, the Netherlands: Backhuys Publ., 1998. – P. 117-129.

Федотов О. В., Волошко Т. Е. Влияние никотиновой кислоты на пероксидазную активность штаммов съедобных лекарственных базидиомицетов *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. и *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. – Рассмотрены результаты культивирования штаммов *Pleurotus ostreatus* и *Lentinus edodes* на питательных средах с никотиновой кислотой в различных концентрациях, которые позволяют оптимизировать среду с целью индукции биосинтеза фермента пероксидазы.

Ключевые слова: съедобные лекарственные базидиомицеты, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, пероксидаза, никотиновая кислота.

Fedotov O. V., Voloshko T. E. Influence of nicotine acid on peroxidase activity of the edible medicinal basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. – Strains the results of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* strains cultivation are considered on the nutrient mediums with nicotine acid in different concentrations which allow to optimise the medium for the induction of peroxidase enzyme biosynthesis.

Key words: edible medicinal basidiomycetes, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, peroxidase, nicotine acid.