

О. В. Федотов, О. М. Брусніцина

ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ ВУГЛЕЦЕВОГО ЖИВЛЕННЯ НА РІСТ І КАТАЛАЗНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМУ P-6v *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ. EX FR.) KUMM.

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

e-mail: fedotov@dongu.donetsk.ua

Федотов О. В., Брусніцина О. М. Вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. – Розглянуто результати культивування штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* на різних вуглецевмісних сполуках, що дозволяють оптимізувати середовище з метою підвищення ростових показників та біосинтезу ферменту каталази.

Ключові слова: їстівні лікарські базидіоміцети, *Pleurotus ostreatus*, каталаза, вуглецевмісні сполуки.

Вступ

Гриби є продуцентами цілого ряду біологічно активних речовин, значна кількість лікарських і профілактичних препаратів виготовляються на основі плодових тіл їстівних лікарських базидіоміцетів [1-6, 8, 18]. Проте перспективним є розробка методів культивування грибів, що дозволяє синтезувати стандартну продукцію із заданими властивостями. Отже, у зв'язку з розвитком біотехнологічних підходів до культивування грибів, важливим є добір оптимальних компонентів живильного середовища, зокрема і вуглецевмісних [10, 11, 19].

Відомо, що дереворуйнівні базидіоміцети здатні засвоювати різноманітні цукри, такі як пентози, галактози, полісахариди типу геміцелюлоз, крохмаль, інулін та ін. Однак деякі гриби чи штами використовують певні вуглецеві сполуки. Залежно від типу джерела вуглецевого живлення базидіальні гриби мають різну динаміку ферментативної активності, біомаси та рН культурального фільтрату. Рівень живлення і співвідношення його компонентів у субстраті, особливо джерел вуглецю і азоту може різко змінювати біосинтетичну функцію цих організмів [14, 16].

Pleurotus ostreatus – глива звичайна, відомий їстівний гриб – ксилотроф, що широко культивується з метою отримання плодових тіл. При культивуванні гливи виявлено речовини, що мають антивірусну, протипухлинну, антифунгальну, радіопротекторну й імуномодулюючу лікарську дію, антиоксидантні властивості та окисно-відновні ферменти [5, 6, 18].

Фермент каталаза (H_2O_2 : оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) виявляє активність у всіх організмів, за виключенням облігатних анаеробів. Сутність каталітичної дії каталази полягає в розкладанні пероксиду водню, що утворюється при дисмутації супероксидного аніона та при аеробному окисненні відновлених флавопротейдів з виділенням молекулярного кисню. Каталаза відноситься до ферментів, що найбільш довго зберігають свою високу активність, майже не потребує енергії активації, швидкість реакції цього ферменту обмежується лише швидкістю дифузії субстрату до активного центру [9, 12]. Тому каталаза, поряд із іншими ензимами, у численних досліджах використовується як маркерний фермент, що адекватно відображає реакцію організмів на зміну факторів живильного чи умов навколишнього середовища. З'ясовано, що каталаза разом із пероксидазами відіграють відповідну захисну роль антиоксидантної системи організму на несприятливі умови життєдіяльності й інфекції під час утворення токсичних сполук реакцій перекисного окиснення ліпідів [7, 13].

Фермент каталаза набув широкого практичного використання для детоксикації H_2O_2 , що утворюється під час біосинтезу; в харчовій, текстильній, шкіряній, електронній промисловостях; у медицині як діагностичний та антиоксидантний засіб. У комерційних цілях фермент отримують з печінки тварин, а також використовують фермент грибного походження – з *Aspergillus niger* [12, 15]. Отже, каталаза – цінний та необхідний фермент у промисловості та медицині.

Метою нашої роботи було дослідження впливу різних джерел вуглецевого живлення на ріст та каталазну активність штаму P-6v *Pleurotus ostreatus*.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження був штам Р-6в *Pleurotus ostreatus*, який у попередніх дослідженнях показав порівняно високий рівень каталазної активності [5].

З метою визначення динаміки накопичення біомаси та зміни активності каталази, дослідний штам культивували поверхнево в колбах Ерленмейера на стерильному глюкозо-пептонному середовищі (рН₀ = 6,5) наступного складу, г/л: глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; КН₂РО₄ – 0,6; К₂НРО₄ – 0,4; MgSO₄ × 7H₂O – 0,5; CaCl₂ – 0,05; ZnSO₄ × 7H₂O – 0,001; дистильована вода – до 1 л (контроль) [15]. Вуглецевмісні сполуки вносили в дослідні живильні середовища в кількості, перерахованій на вміст вуглецю у глюкозі [16].

Культивування проводили при температурі 27,5°C протягом 15 діб.

На 9 і 15-ту добу росту штаму Р-6в визначали біомасу міцелію та рівень каталазної активності гомогенату міцелію (МГ). Ріст штаму оцінювали за накопиченням біомаси (абсолютно сухий міцелій) ваговим методом [10]. Каталазну активність (КА) визначали за методом, за яким пероксид водню здатний утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26, при довжині хвилі 410 нм супроти нульової проби з дистильованою водою. Каталазну активність розраховували за формулою [15]:

$$E = (A_k - A_d) \times V \times t \times k \times p \text{ (мкат/л)}, \quad (1)$$

де E – активність каталази (мкат/л), A_k та A_d – екстинкція контрольної та дослідної проб, V – об'єм проби, що вносили (0,1 мл), t – час інкубації (600 с), k – коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню, що дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, p – коефіцієнт розведення.

Отримані експериментальні дані обробляли за допомогою дисперсійного аналізу, порівняння середніх арифметичних проводили за методом Дункана [17].

Результати та їх обговорення

Динаміка росту і каталазної активності штаму Р-6в залежно від джерела вуглецевого живлення у живильному середовищі представлена в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність штаму Р-6в *Pleurotus ostreatus*

Вуглецевмісні сполуки	Вік культури, доба			
	9		15	
	Біомаса, г/л	КА МГ, мкат/л 10 ³	Біомаса, г/л	КА МГ, мкат/л 10 ³
Моносахариди (пентози)				
L-(+)-арабіноза	0,98 ± 0,01	698,63 ± 2,28	6,21 ± 0,01	658,23 ± 3,53
D-(+)-ксилоза	1,79 ± 0,06	435,12 ± 7,72	2,59 ± 0,06	577,20 ± 6,99
Моносахариди (гексози)				
DL-глюкоза (контроль)	10,49 ± 0,05	631,59 ± 9,57	17,48 ± 0,02	695,97 ± 5,88
L-(+)-рамноза	0,11 ± 0,02	347,25 ± 9,28	3,31 ± 0,06	401,82 ± 7,43
D-(+)-манноза	1,19 ± 0,01	221,42 ± 1,01	3,19 ± 0,01	278,61 ± 5,58
Олігосахариди (дисахариди)				
D-(+)-лактоза	1,04 ± 0,02	724,83 ± 1,65	2,81 ± 0,01	650,46 ± 2,99
DL-сахароза	10,21 ± 0,04	587,89 ± 9,45	8,23 ± 0,01	631,59 ± 4,67
Олігосахариди (трисахариди)				
DL-рафіноза	1,85 ± 0,01	710,40 ± 2,84	0,59 ± 0,01	519,48 ± 7,54
Полісахариди				
Крохмаль	4,41 ± 0,01	407,21 ± 6,22	6,40 ± 0,04	410,70 ± 4,45
Целюлоза	1,99 ± 0,03	744,59 ± 2,11	3,15 ± 0,01	623,82 ± 2,68

Експериментальні дані досліду та їх статистичний аналіз свідчать про наступне.

На 9-ту добу культивування максимальний ріст штаму P-6v зафіксовано на середовищі, що включало як джерело вуглецю глюкозу (контроль). За порядком зниження ростового показника, вуглецевмісні компоненти середовища розмістилися наступним чином: сахароза, крохмаль, целюлоза, рафіноза, ксилоза, манноза, лактоза, арабіноза та рамноза. За впливом на ферментативну активність міцелію дослідженого штаму, джерела вуглецю вірогідно відрізняються від ростового: максимальну каталазну активність міцелію встановлено на середовищі з целюлозою; далі у порядку зниження активності ферменту ідуть лактоза, рафіноза, арабіноза, глюкоза, сахароза, ксилоза, крохмаль, рамноза та манноза.

На 15-ту добу культивування, максимальна каталазна активність міцелію і ріст штаму P-6v зафіксовані на середовищі, що містило глюкозу (контроль). За позитивним впливом на КА, цукристі речовини розташувалися у порядку: арабіноза, лактоза, сахароза, целюлоза, ксилоза, рафіноза, крохмаль, рамноза та манноза. Залежність накопичення біомаси від типу вуглецевого джерела живильного середовища має такий вигляд: максимальний ріст зафіксовано на глюкозі, потім сахароза, крохмаль, арабіноза, рамноза, манноза, целюлоза, лактоза ксилоза, найнижчий ріст відмічено на рафінозі.

Висновки

Встановлено вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. та залежність його від часу культивування. Кращими вуглецевмісними компонентами живильного середовища для отримання біомаси штаму P-6v є глюкоза, сахароза, крохмаль; для підвищення каталазної активності міцелію – глюкоза та сахароза. Отримані дані можна буде використовувати під час розробки живильного середовища для культивування штаму P-6v як продуцента ферменту каталази міцеліального походження.

Список літератури

1. Бабицкая В. Г., Трухоновец В. В., Смирнов Д. А. и др. Физиологически активные соединения плодовых тел ксилотрофных базидиомицетов // Тез. докл. II съезда микологов России "Современная микология в России". – М., 2008. – С. 118-119.
2. Бадалян С. М. Биологическая активность высших грибов (Basidiomycotina) // Биол. журн. Армении. – 1998. – Т. 51, вып. 4. – С. 289-301.
3. Бадалян С. М., Серрано Ж. Ж., Ле Куфнг Ж.. Химическое и фармакологическое исследование высших грибов // Микол. и фитопатол. – 1997. – Т. 31, вып. 1. – С. 42-45.
4. Белова Н. В. Современные направления исследования и методы анализа макромицетов // Тез. докл. II съезда микологов России "Современная микология в России". – М., 2008. – С. 107-108.
5. Брусніцина О. М., Федотов О. В. Каталазна активність штамів грибів *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. і *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. // Матер. Міжнар. конф. "Актуальні проблеми ботаніки та екології". – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 53-54.
6. Бухало А. С., Соломко Е. Ф., Митропольская Н. Ю. Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями // Укр. ботан. журн. – 1996. – 53, № 3. – С. 192-201.
7. Гесслер Н. Н., Соколов А. В., Быховский В. Я., Белозерская Т. А. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каратиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – 38, № 3. – С. 237-242.
8. Денисова Н. П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. – СПб., 1998. – 59 с.
9. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 899 с.
10. Дудка И. А., Вассер С. П., Элланская И. А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
11. Линовичкая В. М., Дзыгун Л. П., Клечак И. Р., Бухало А. С. Влияние различных

источников азота и углерода на рост высших дереворазрушающих базидиальных грибов // Тез. докл. II съезда микологов России "Современная микология в России". – М., 2008. – С. 335.

12. Михайлова Р. В., Осока О. М., Лобанок А. Г. Образование внеклеточной каталазы видами рода *Penicillium* // Микология и фитопатология. – 2001. – 35, вып. 3. – С. 43-46.

13. Мороз И. В., Михайлова Р. В. Морфолого-физиологическая характеристика *Penicillium ricesum* F-648 – продуцента каталазы // Тез. докл. II съезда микологов России "Современная микология в России". – М., 2008. – С. 335.

14. Негруцкий С. Ф. Физиология и биохимия низших растений: Учеб. пособие. – К.: Вища шк., 1990. – 191 с.

15. Патент 39243 А України. Спосіб визначення каталазної активності базидіоміцетів / Федотов О. В., Гавриленко Г. В. Заявка № 2000116560, від 21.11.00, кл. 7С12N9/58, Бюл. № 5, від 15.06.2001.

16. Федотов О. В. Активні продуценти молокозгортаючих ферментів серед гіменомицетів, їх біологічні особливості та перспективи застосування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 1995. – 20 с.

17. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.

18. Tardif A. La Mycotherapie où Les propriétés Medicinales des Champignons. – Paris, 2000. – 167 p.

19. Wasser S. P., Weis A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives // IJMM. – 1999. – V. 1. – P. 31-62.

Федотов О. В., Брусницына О. М. Влияние источников углеродного питания на рост и каталазную активность штамма P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. – Рассмотрены результаты культивирования штамма P-6v *Pleurotus ostreatus* на различных углеродсодержащих соединениях, которые позволяют оптимизировать среду с целью повышения ростовых показателей и биосинтеза фермента каталазы.

Ключевые слова: съедобные лекарственные базидиомицеты, *Pleurotus ostreatus*, каталаза, углеродсодержащие соединения.

Fedotov O. V., Brusnitscina O. M. Influence of sources of carbon nutrition growth and catalase activity of strain P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. – Strain the results of cultivation of strain P-6v *Pleurotus ostreatus* on various carbonaceous compounds are considered which allow to optimize medium with the purpose of rising growth indexes and biosynthesis of an enzyme of a catalase.

Key words: edible medicinal basidiomycetes, *Pleurotus ostreatus*, catalase, carbonaceous compounds.