

О.В. Федотов, Т.Є. Волошко

Донецький національний університет,
вул. 600-річчя, 21, Вінниця, 21001, Україна,
тел.: +38 (062) 302 06 00, e-mail: bio.graff@ukr.net

ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ДЕЯКИХ БАЗИДІОМІЦЕТІВ

*Метою роботи було отримання та аналіз ферментних препаратів оксидоредуктаз деяких видів базидіоміцетів. Методи. Як продуценти оксидоредуктаз використовували штами *Agrosybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208. Обрані штами базидіоміцетів культивували на модифікованому для кожного штаму глюкозо-пептонному середовищі. Фракціонування ферментів з культурального фільтрату та водних екстрактів міцелію проводили шляхом висолювання сульфатом амонію. Отримані розчини фракцій білків піддавали подальшому очищенню шляхом діалізу та гель-фільтрації на гранулах Молселекту G-50 і G-75. Результати. Отримано ферментні препарати внутрішньо- і позаклітинних оксидоредуктаз – пероксидаз, каталаз та супероксиддисмутаз з культур базидіоміцетів. Встановлено індивідуальні характеристики ферментів: ферментативну активність, рН- та термостабільність. Дослідженні штами базидіоміцетів мають більші високі рівень активності позаклітинних оксидоредуктаз порівняно з внутрішньоклітинними. Найвища пероксидазна активність ферментного препарату штаму *A. cylindracea* 167 становила $6,2 \pm 0,2$ Е/ мг, каталаза штаму *P. ostreatus* P-208 – 9181 ± 293 мкат/ мг та супероксиддисмутази штаму *F. hepatica* Fh-08 – $101,6 \pm 3,5$ Е/ мг. Всі ферменти стабільні в діапазоні рН 5–10, та температурі – від 20 до 40 °С. Висновок. Отримано нові антиоксидантні ензими базидіоміцетів *Agrosybe cylindracea*, *Fistulina hepatica* і *Pleurotus ostreatus* та встановлені їх ферментативна активність, рН- і термостабільність. За цими ознаками виділені ензими не поступаються використовуваним в промисловості та є перспективними для практичного застосування.*

Ключові слова: базидіоміцети, оксидоредуктаза, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза.

Вивчення біологічної різноманітності, метаболічних шляхів та розробка способів культивування показали перспективність використання ксилотрофних базидіоміцетів у біотехнології. Це ґрунтується на їх здатності рости на дешевих живильних середовищах [12], плодоносити, утворювати значну біомасу з певними корисними властивостями та синтезувати численні біологічно активні речовини (БАР) [6, 15]. Особливе місце серед грибних БАР займають ензими різного спектру дії. Доведено, що за субстратною специфічністю, температурними і рН оптимумами дії та низкою інших властивостей вони більш повно відповідають певним вимогам практичного використання [12, 15].

© О.В. Федотов, Т.Є. Волошко, 2014



Науковий та комерційний інтерес мають оксидоредуктази, зокрема пероксидази [8, 14], каталази [5] та супероксиддисмутази [1, 5]. Основними джерелами промислових ензимів є рослини (пероксидаза), тварини (каталаза) та мікроорганізми (СОД). Проте отримання цих ферментів пов'язане з низкою труднощів: дефіцитом сировини, вартістю методів виділення та очищення ферментних препаратів [12].

Проведені скринінгові дослідження дозволили виділити штами базидіоміцетів *Agrocybe cylindracea* 167, *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208 – активних продуцентів пероксидаз, супероксиддисмутаза та каталаз відповідно [5]. Для обґрунтування їх подальшого використання після удосконалення складу глюкозо-пептонного середовища та умов культивування [3] метою роботи було отримання та аналіз ферментних препаратів оксидоредуктаз цих базидіоміцетів.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами *A. cylindracea* 167, *F. hepatica* Fh-08 та *P. ostreatus* P-208, які зберігаються у Колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету та депоновані у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (ІВК) [11].

Процес отримання ферментних препаратів (ФП) внутрішньо- та позаклітинних каталаз, пероксидаз та супероксиддисмутаза штамів *A. cylindracea* 167, *F. hepatica* Fh-08, *P. ostreatus* P-208 включав етапи, наведені на рис. 1.

Штами культивували поверхнево на модифікованому для кожного штаму глюкозо-пептонному середовищі (ГПСм) 15 діб при $27 \pm 1^\circ\text{C}$ [3]. Модифіковане ГПС для культивування штамів *A. cylindracea* 167 і *F. hepatica* Fh-08 містило (г/л): глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 0,6; K_2HPO_4 – 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,05; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; казеїн – 0,5 та вітамін С – 0,05, який вносили на початку культивування першого штаму або за 1 добу до експерименту – другого та дистильовану воду. Модифіковане ГПС для культивування штаму *P. ostreatus* P-208 у порівнянні із попереднім не містило вітаміну С, а замість казеїну включало валін – 0,3 та MnSO_4 – 1,45 г/л, які вносили на початку культивування [2]. Згідно попередніх досліджень збільшення активності оксидоредуктаз [4], штам *A. cylindracea* 167 за 1 добу до експерименту піддавали дії електромагнітного поля з частотою $27 \pm 0,16$ Гц та потужністю 70 ± 21 Вт на апараті УВЧ-66 протягом години, а штами *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 – з частотою 0,8–2,4 ГГц та потужністю 1 мВт протягом всього терміну культивування. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури на сусло-агарі, об'ємом 5–7% від об'єму ГПСм.

Для отримання ферментних препаратів використовували міцелій та культуральний фільтрат (КФ) 15 добових культур. Міцелій та КФ розділяли шляхом фільтрування культуральної рідини. Клітини міцелію піддавали механічній деградації та екстрагували дистильованою водою 1:10. Фракціонування біл-



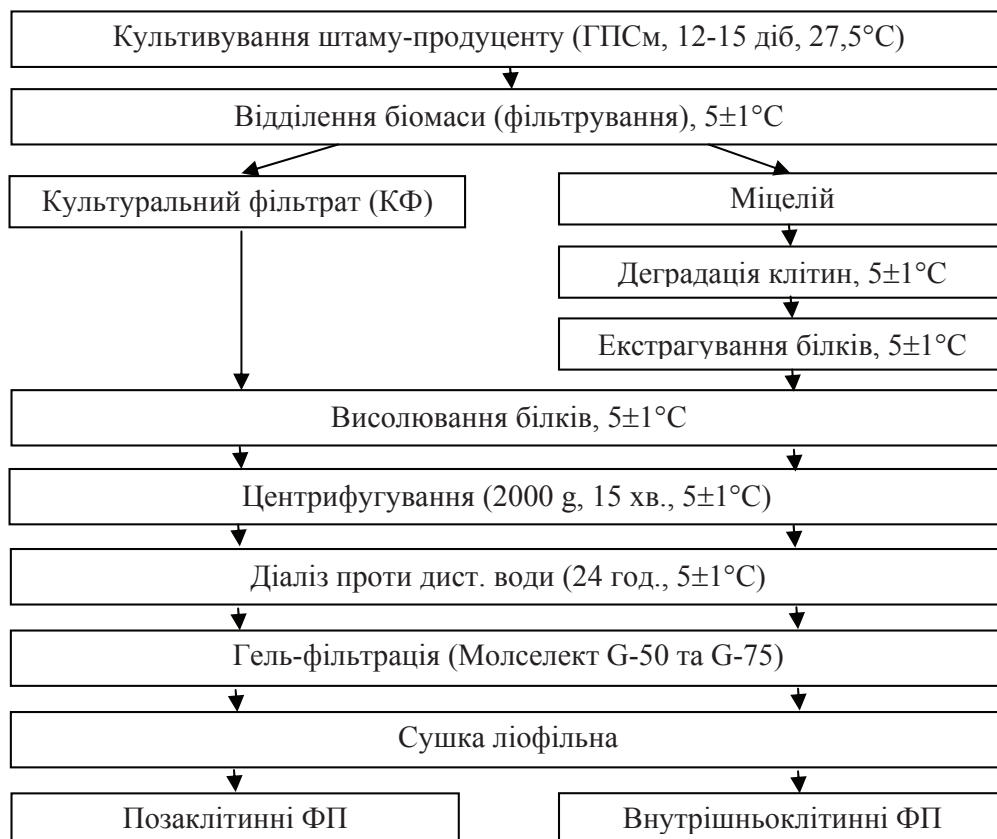


Рис. 1. Схема отримання ферментних препаратів оксидоредуктаз

Fig. 1. Scheme of obtaining oxidoreductases enzymes preparation (EP)

ків проводили шляхом розчинення сульфату амонію до 40–70% насичення для висолювання пероксидаз та 80% – каталаз та супероксиддисмутаз. Фракцію білка, яка утворила осад, відділяли центрифугуванням при 2000 g та $5\pm 0,5$ °C.

Первинну очистку білкової фракції проводили діалізом проти охолодженої до $5\pm 0,5$ °C дистильованої води. Для прискорення дифузії, розчинник декілька разів замінювали до повного очищення розчину білків від сульфату амонію. Отримані фракції білків піддавали подальшому очищенню шляхом гель-фільтрації на гранулах Молселекту G-50 та G-75.

Розчини білків ліофільно висушували, одержуючи таким чином внутрішньо- та позаклітинні ферментні препарати (ФП_в та ФП_п), які мали вигляд порошку від світло-сірого до світло-кремового забарвлення.

Активність оксидоредуктаз міцелію, КФ та ФП визначали спектрофотометричними методами: пероксидазну активність (РОХ activity) – за інтенсивністю забарвлення продукту окиснення о-діанізидину H_2O_2 та виражали в умовних одиницях кількості ферменту, яка каталізує окиснення одного мкмо-

ля о-діанізидину за 1 хвилину [8]; каталазну активність (CAT activity) – за забарвленням продукту реакції H_2O_2 з молібдатом амонію та виражали у мкат [5]; супероксиддисмутазну активність (SOD activity) – за здатністю цього ферменту інгібувати реакцію аутоокиснення адреналіну в лужному середовищі, та виражали в умовних одиницях, що відповідає 1% пригнічення швидкості аутоокиснення адреналіну під дією СОД [5].

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі-Фоліна [13]. На основі отриманих результатів розраховували питому пероксидазну, каталазну та супероксиддисмутазну активності за формулою:

$$A_{\text{пт}} = A / C_{\text{б}},$$

де: $A_{\text{пт}}$ – питома активність відповідного ферменту, A – активність відповідного ферменту, $C_{\text{б}}$ – концентрація білка.

Стабільність ферментів за різних значень рН визначали за рівнем залишкової активності їх розчинів після 60 хв експозиції при 25 °С в калій-фосфатному буфері з рН від 2,0 до 12,0; а термостабільність – після 60 хв експозиції при 10, 20...90 °С з рН 7,0.

Експерименти проводили у 6-кратній повторності. Отримані експериментальні дані піддавали статистичній обробці згідно керівництву [7]. Для оцінки статистичної значущості відмінностей використовували рівень достовірності $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Результати аналізу ферментних препаратів показали (табл.), що пероксидазна активність ФП_п штаму *A. cylindracea* 167 є найвищою і в 31 раз перевищує таку штаму *P. ostreatus* P-208 та в 3,4 разу – штаму *F. hepatica* Fh-08. Щодо ФП_в, штаму *A. cylindracea* 167, то його РОХ activity в 10,5 разу вища за цей показник штаму *F. hepatica* Fh-08 та в 5,3 разу – штаму *P. ostreatus* P-208. Вихід ферментних препаратів пероксидаз штаму *A. cylindracea* 167 становив $0,16 \pm 0,02$ г на кг сирової маси міцелію та $0,15 \pm 0,03$ г на літр КФ. Отже, штам *A. cylindracea* 167 показав найвищу РОХ activity як КФ та міцелію при скрипінгових дослідженнях [5], так і виділених ФП.

Найвищу CAT activity встановлено для ФП_п штаму *P. ostreatus* P-208 [5]. Каталазна активність ФП_п цього штаму перевищує такий показник штаму *A. cylindracea* 167 в 2,3 разу, а штаму *F. hepatica* Fh-08 – в 2,2 рази. CAT activity ФП_в штаму *P. ostreatus* P-208 незначно перевищувала цей показник ФП_в штаму *A. cylindracea* 167 та була нижчою майже в 2 рази ніж у штаму *F. hepatica* Fh-08. Вихід ферментних препаратів каталаз штаму *P. ostreatus* P-208 становив $0,18 \pm 0,02$ г на кг сирової маси міцелію та $0,19 \pm 0,03$ г на літр КФ.

Як продуцент ФП супероксиддисмутази обрано штам *F. hepatica* Fh-08 [5]. SOD activity ФП цього штаму найвища серед досліджуваних і перевищує таку активність ФП_п штаму *P. ostreatus* P-208 в 3,5 разу, штаму *A. cylindracea* 167 – в 2,2 разу та ФП_в обох штамів – в 5,7 разу. Позаклітинні ФП СОД штаму



F. hepatica Fh-08 в 3,8 разу активніші за внутрішньоклітинні. Вихід ферментних препаратів супероксиддисмутаза штаму *F. hepatica* Fh-08 становив $0,12 \pm 0,02$ г на кг сирової маси міцелію та $0,18 \pm 0,03$ г на літр КФ.

Таблиця

Активність оксидоредуктаз ферментних препаратів штамів базидіоміцетів

Table

Activity of oxidoreductases of enzyme preparations of strains Basidiomycetes

Штам	POX activity, Е/ мг		CAT activity, мкат / мг		SOD-activity, Е/ мг	
	ФП _н	ФП _в	ФП _н	ФП _в	ФП _н	ФП _в
<i>A. cylindracea</i> 167	6,2 $\pm 0,2$	2,1 $\pm 0,1$	4081 ± 104	942 ± 40	45,3 $\pm 0,2$	4,7 $\pm 0,1$
<i>F. hepatica</i> Fh-08	1,8 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,0$	4266 ± 29	2010 ± 35	101,6 $\pm 3,5$	26,6 $\pm 0,7$
<i>P. ostreatus</i> P-208	0,2 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,1$	9181 ± 293	1010 ± 10	29,1 $\pm 0,9$	4,69 $\pm 0,1$

Слід зазначити, що всі дослідженні штами базидіоміцетів мають більш високий рівень активності позаклітинних оксидоредуктаз порівняно з внутрішньоклітинними. Скоріш за все, це пов'язано з приналежністю їх до групи грибів білої гнилі – лігнотрофів. Особливості живлення останніх зумовлюють найвищу активність комплексу саме позаклітинних оксидоредуктаз [12].

Наступним етапом дослідження було визначення деяких фізико-хімічних властивостей отриманих ФП. Так, 0,1% водні розчини ФП пероксидаз мають рН від 4,8 (штам *F. hepatica* Fh-08) до 5,8 (штам *P. ostreatus* P-208); каталази – від 5,3 (штам *P. ostreatus* P-208) до 6,2 (штам *A. cylindracea* 167); супероксиддисмутаза – від 6,5 (штам *F. hepatica* Fh-08) до 7,5 (штам *A. cylindracea* 167).

Як видно з рис. 2–4, всі отримані ферментні препарати пероксидаз мають профіль рН-стабільності ферментів в межах рН 5,0–7,0 для штаму *A. cylindracea* 167, рН 4,0–6,0 – для штаму *F. hepatica* Fh-08 та рН 7,0–8,0 – для штаму *P. ostreatus* P-208. За вкрай низьких та високих значень рН (2,0 та 12,0) пероксидазна активність втрачається майже повністю. Це пояснюється тим, що переважна більшість їх, за винятком деяких ядерних білків, є кислими та негативно зарядженими.

Профіль рН-стабільності ФП внутрішньоклітинних пероксидаз порівняно з ФП позаклітинних пероксидаз для штаму *A. cylindracea* 167 лежить в інтервалі рН 6,0–8,0; для штаму *F. hepatica* Fh-08 – 4,0–6,0; для штаму *P. ostreatus* P-208 – 5,0–8,0. При рН 2,0 та 12,0 пероксидазна активність штаму *F. hepatica* Fh-08 та штаму *P. ostreatus* P-208 втрачається майже повністю, а штаму *A. cylindracea* 167 пригнічується на 76% при рН 2,0 та на 90% при рН 12,0.



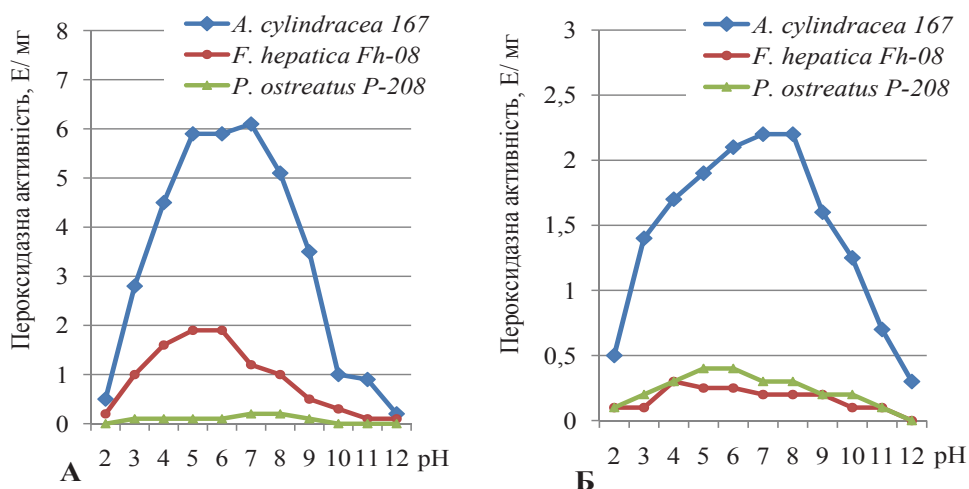


Рис. 2. Стабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП пероксидаз штамів базидіоміцетів за різних рН

Fig. 2. Stability of extracellular (A) and intracellular (B) EP of basidiomycetes strains peroxidase at different pH

Вивчення рН-стабільності позаклітинних каталаз показало, що профіль цього показника штаму *P. ostreatus* P-208 лежить в межах рН 5,0–7,0; штаму *A. cylindracea* 167 – рН 4,0–7,0; штаму *F. hepatica* Fh-08 – рН 7,0–8,0. При рН 2,0 каталазна активність найбільше знижується – на 97% від максимуму для штаму *F. hepatica* Fh-08, а найменше – на 75% для штаму *A. cylindracea* 167. При рН 12,0 каталазна активність знижується на 92–97%.

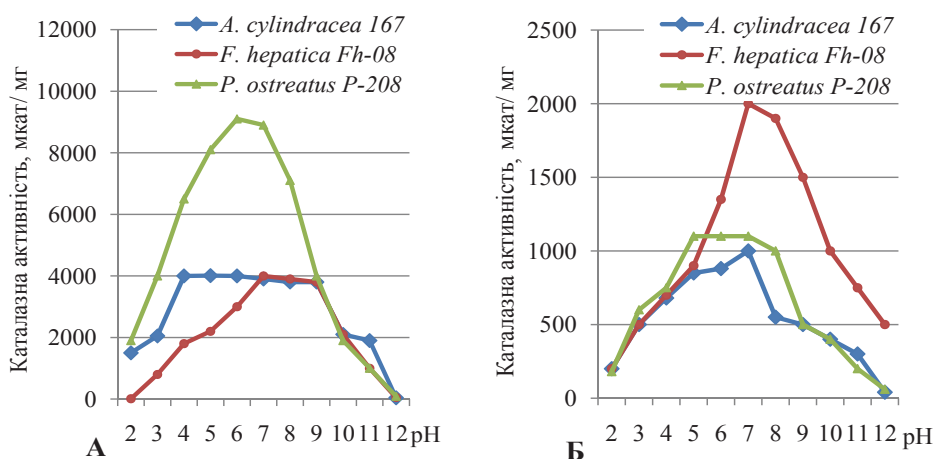


Рис. 3. Стабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП каталаз штамів базидіоміцетів за різних рН

Fig. 3. Stability of extracellular (A) and intracellular (B) EP of basidiomycetes strains catalases at different pH



При дослідженні рН-стабільності внутрішньоклітинних каталаз встановлено ті ж закономірності, що і для позаклітинних каталаз.

Профіль рН-стабільності позаклітинних супероксиддисмутаз, на відміну від пероксидаз, у більшості випадків зсунутий в бік слабколужних значень. Так, межі рН-стабільності цих ферментів штаму *F. hepatica* Fh-08 зафіксовано за рН 6,0–11,0; штаму *A. cylindracea* 167 – за рН 5,0–8,0; штаму *P. ostreatus* P-208 – за рН 6,0–9,0. Слід відзначити, що супероксиддисмутази штаму *F. hepatica* Fh-08 є стабільними у лужному середовищі: за рН 12,0 їх активність знижується лише на 25%.

Дослідження рН-стабільності внутрішньоклітинних супероксиддисмутаз показало, що межі цього показника штаму *F. hepatica* Fh-08 лежать за рН 7,0–10,0; штаму *A. cylindracea* 167 – за рН 5,0–8,0; штаму *P. ostreatus* P-208 – за рН 5,0–9,0. ФП як внутрішньоклітинної, так і позаклітинної СОД штаму *F. hepatica* Fh-08 стабільніші при слабколужному рН 7,0–10,0 та втрачають свою активність при рН 12,0 на 44% порівняно з максимальною.

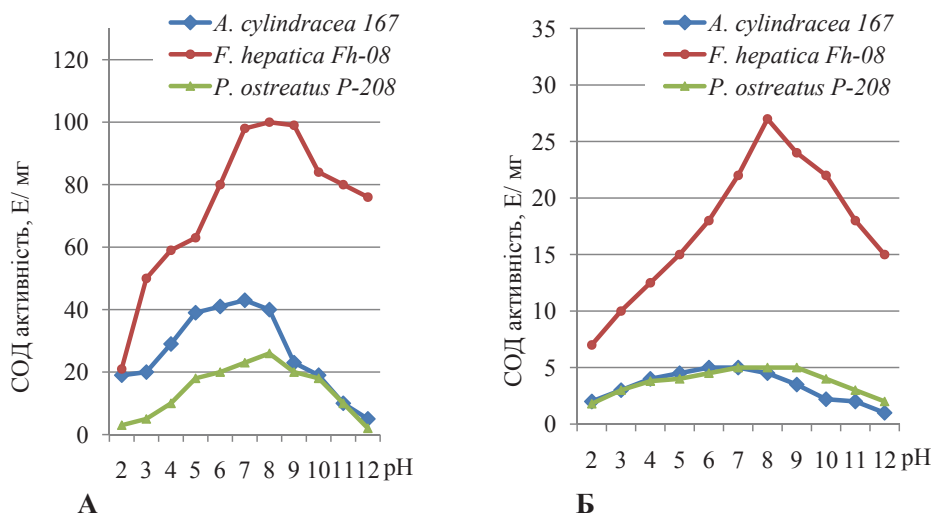


Рис. 4. Стабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП супероксиддисмутаз штамів базидіоміцетів за різних рН

Fig. 4. Stability of extracellular (A) and intracellular (B) EP of basidiomycetes strains superoxide dismutase at different pH

Отже, проведені дослідження з рН-стабільності отриманих ферментів показали, що всі вони стабільні в діапазоні рН 5–10. За вкрай низьких та високих значень рН активність всіх досліджених ферментів значно знижується, за виключенням супероксиддисмутази штаму *F. hepatica* Fh-08, яка є відносно стабільною у лужному середовищі.

Встановлено (рис. 5), що досліджені ферментні препарати позаклітинних пероксидаз є стабільними у діапазоні температур 20–30°C і за температури, що

є вищою відбувається їх часткова інактивація. Інкубація протягом 60 хв при 70–90 °С призводить до їх повної інактивації.

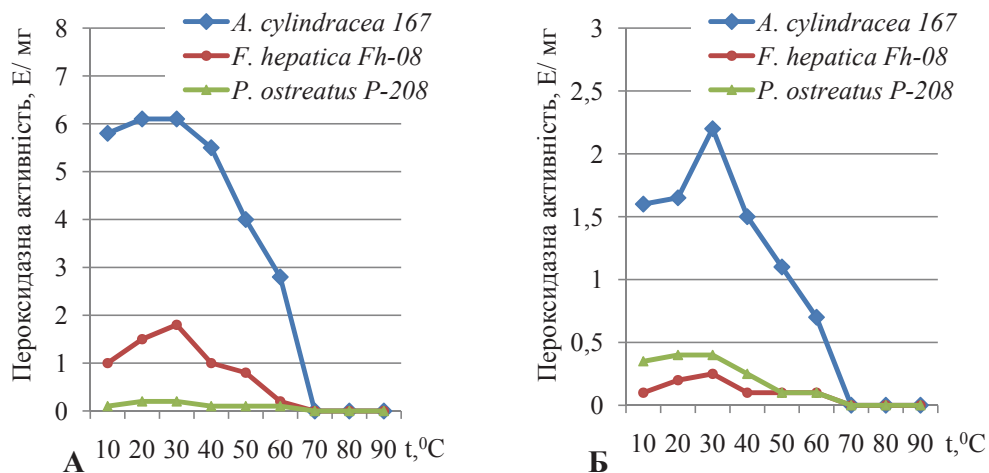


Рис. 5. Термостабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП пероксидаз

Fig. 5. Thermostability of extracellular (A) and intracellular (B) peroxidase EP

Дослідження термостабільності внутрішньоклітинних пероксидаз базидіоміцетів показало таку ж тенденцію, як і для позаклітинних. Вивчені ферменти є стабільними при 20–30 °С для штамів *F. hepatica* Fh-08 і *P. ostreatus* P-208 та при 30 °С для штаму *A. cylindracea* 167. При 70–90 °С відбувається повна інактивація досліджених ензимів.

Аналіз даних термостабільності внутрішньо- та позаклітинних каталаз показав (рис. 6), що діапазон цього показника всіх отриманих ферментних препаратів лежить в межах 20–40 °С. При зниженні температури до 10 °С втрачається від 40% (штам *A. cylindracea* 167) до 63% (штам *P. ostreatus* P-208) каталазної активності. При підвищенні температури до 80 °С зафіксована незначна залишкова каталазна активність ФП, а при 90 °С вона втрачається повністю.

Діапазон термостабільності супероксиддисмутаза (рис. 7) є дещо вищим за цей показник для пероксидаз та каталаз та відповідає знаходиться в межах 30–40 °С. При зниженні температури до 10 °С втрачається від 37% (штам *P. ostreatus* P-208) до 70% (штам *F. hepatica* Fh-08) супероксиддисмутазної активності ФП. При підвищенні до 80 °С виявлена їх незначна залишкова активність та повна інактивація при 90 °С.

Отже, всі отримані ферментні препарати є стабільними при рН, що лежить в інтервалі від 5 до 10 та температурі – від 20 до 40 °С. За цими ознаками та ферментативною активністю виділені ензими не поступаються використовуваним у промисловості [5].

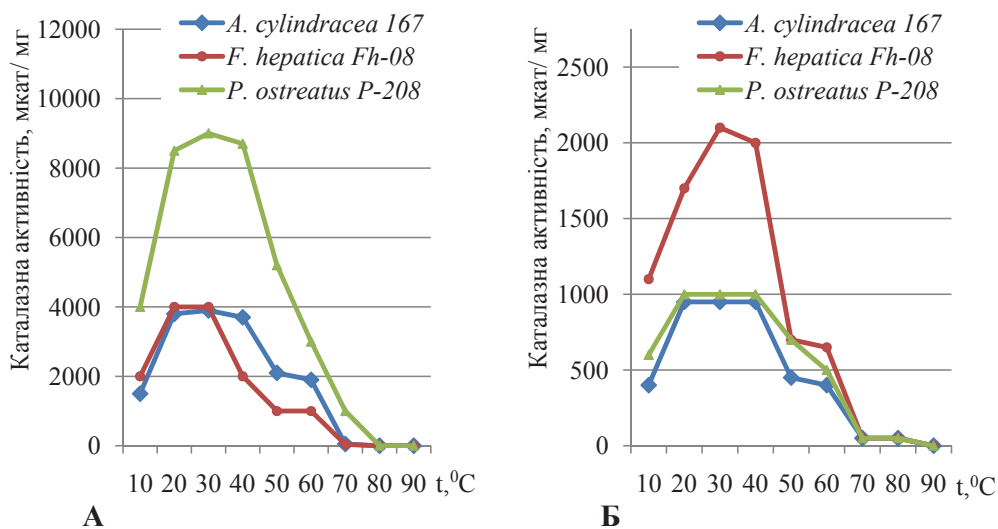


Рис. 6. Термостабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) каталаз EP
 Fig. 6. Thermostability of extracellular (A) and intracellular (B) catalases EP

Встановлені фізико-хімічні характеристики досліджених ферментів, ймовірно, зумовлені особливостями живлення досліджених ксилотрофних базидіоміцетів та наявністю різних ізоформ серед позаклітинних ензимів. Зокрема, для лігнотрофів є характерним переважання серед позаклітинних пероксидаз – лігнінпероксидаз [12, 14].

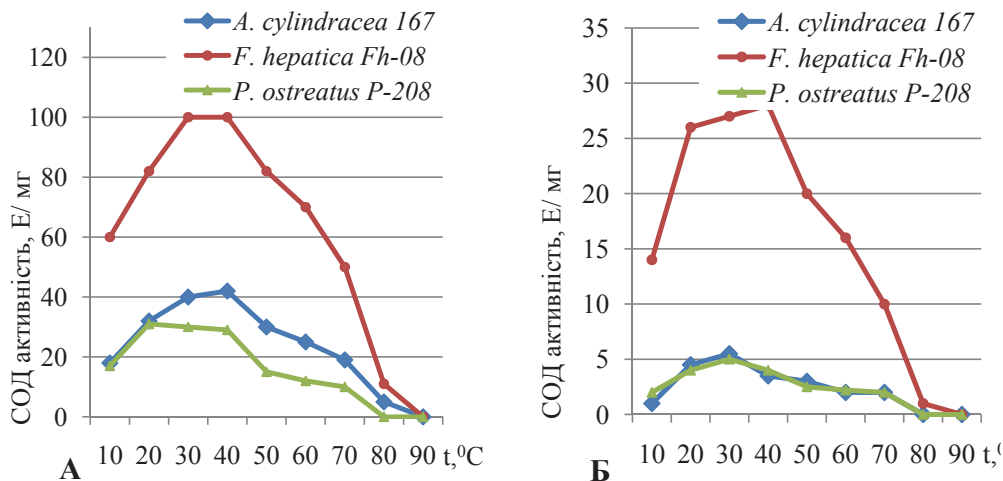


Рис. 7. Термостабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП супероксиддисмутаза

Fig. 7. Thermostability of extracellular (A) and intracellular (B) superoxide dismutase EP

Таким чином, вперше отримано та проведено вивчення ферментних препаратів пероксидаз, каталаз та супероксиддисмутаз внутрішньо- та позаклітинного походження штамів базидіальних грибів *Agrocybe cylindracea* 167, *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208. Встановлено індивідуальні характеристики – ферментативну активність ФП, їх рН- і термостабільність. Показано, що штам *A. cylindracea* 167 є активним продуцентом позаклітинної пероксидази, штам *P. ostreatus* P-208 – позаклітинної каталази, а штам *F. hepatica* Fh-08 – позаклітинної супероксиддисмутази. Результати скринінгу високоактивних продуцентів оксидоредуктаз серед представників відділу *Basidiomycota*, вивчення закономірностей їх культивування та біосинтезу, апробації способів отримання ферментних препаратів пероксидаз, каталаз та супероксиддисмутаз внутрішньо- та позаклітинного походження дозволяють отримати нові антиоксидантні ензими, які мають широкі перспективи використання у різних галузях промисловості, медицині та екології.

О.В. Федотов, Т.Е. Волошко

Донецкий национальный университет,
ул. 600-летия, 21, Винница, 21001, Украина,
тел.: +38 (062) 302 06 00, e-mail: bio.graff@ukr.net

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Реферат

Целью работы было получение и анализ ферментных препаратов оксидоредуктаз некоторых видов базидиомицетов. **Методы.** В качестве продуцентов оксидоредуктаз использовали штаммы *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08 и *Pleurotus ostreatus* P-208. Отобранные штаммы базидиомицетов культивировали на модифицированной для каждого штамма глюкозопептонной среде. Фракционирование ферментов из культурального фильтрата и водных экстрактов мицелия проводили путем высаливания сульфатом аммония. Полученные растворы фракций белков подвергали дальнейшей очистке путем диализа и гель-фильтрации на гранулах Молселекта G-50 и G-75. **Результаты.** Получены ферментные препараты вне- и внутриклеточных оксидоредуктаз – пероксидаз, каталаз и супероксиддисмутаз из культур базидиомицетов. Установлены индивидуальные характеристики ферментов: ферментативная активность, рН- и термостабильность. Исследованные штаммы базидиомицетов имеют более высокий уровень активности внеклеточных оксидоредуктаз по сравнению с внутриклеточными. Максимальная пероксидазная активность ферментного препарата штамма *A. cylindracea* 167 составляла $6,2 \pm 0,2$ Е/мг, каталаза штамма *P. ostreatus* P-208 – 9181 ± 293 мкат/мг и супероксиддисмутаза штамма *F. hepatica* Fh-08 – $101,6 \pm 3,5$ Е/мг. Все ферменты стабильны в диапазоне рН 5–10 и температуре – от 20 до 40 °С. **Вывод.** Получены новые антиоксидантные энзимы базидиомицетов



Agrocybe cylindracea; Fistulina hepatica, Pleurotus ostreatus и установленны их индивидуальные свойства: ферментативная активность, pH и термостабильность. По установленным признакам выделенные энзимы не уступают используемым в промышленности и являются перспективными для практического применения.

Ключевые слова: базидиомицеты, оксидоредуктазы, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза.

O.V. Fedotov, T.E. Voloshko

Donetsk National University,
21, 600th anniversary str., Vinnitsa, 21001, Ukraine,
tel.: +38 (062) 302 06 00, e-mail: bio.graff@ukr.net

PRODUCTION AND ANALYSIS OF ENZYME PREPARATIONS OF OXIDOREDUCTASES OF SOME BASIDIOMYCETES

Summary

Aim. To obtain and analyze the oxidoreductase enzyme preparations of some species of Basidiomycetes. **Methods.** The strains *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08 and *Pleurotus ostreatus* P-208 were used as the producers of oxidoreductases. The selected strains of Basidiomycetes were cultured on modified for each strain glucose-peptone medium. Fractionation of the enzyme from the culture filtrate and mycelium aqueous extracts was carried out by salting out with ammonium sulfate. The obtained solutions of protein fractions were further purified by dialysis and gel filtration on Molselekt pellet G-50 and G-75. **Results.** The enzyme preparations of extracellular and intracellular oxidoreductases such as peroxidase, catalase and superoxide dismutase were obtained from the cultures of Basidiomycetes. Basidiomycetes strains which were tested had individual characteristics of enzymes and enzymatic activity, pH and thermal stability. These strains of Basidiomycetes have a higher level of activity of extracellular oxidoreductases compared with intracellular. Maximum peroxidase activity of the enzyme preparation of *A. cylindracea* strain 167 was marked at 6.2 ± 0.2 U/mg, catalase of strain *P. ostreatus* P-208 was marked at 9181 ± 293 MAb/mg and superoxide dismutase of strain *F. hepatica* Fh-08 was marked at 101.6 ± 3.5 U/mg. All enzymes are stable in the pH range of 5–10 and at temperature from 20 to 40 °C. **Conclusion.** New antioxidant enzymes Basidiomycetes *Agrocybe cylindracea*, *Fistulina hepatica*, *Pleurotus ostreatus* were obtained. Their individual properties: enzyme activity, pH and temperature stability were established. According to the established properties are not inferior to the selected enzymes used in industry and they are promising for practical application.

Key words: basidiomycetes, oxidoreductase, catalase, peroxidase, superoxide dismutase.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465–474.
2. Волошко Т.Є. Вплив деяких мікроелементів на активність оксидоредуктаз базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікроб. і біотехнол., 2013. – № 1(21). – С. 63–80.
3. Волошко Т.Є. Вплив джерел азотного живлення на активність оксидоредуктаз деяких штамів базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Актуальні проблеми ботаніки та екології. – Ужгород, 2012. – С. 197–198.
4. Волошко Т.Є. Вплив електромагнітних полів на активність оксидоредуктаз деяких видів базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Біологічний вісник МДПУ ім. Богдана Хмельницького, 2013. № 2 (8). – С. 45–56.
5. Волошко Т.Є. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікроб. і біотехнол., 2011. – № 4(16). – С. 69–81.
6. Дудка И.А. Культивирование съедобных грибов. / И.А. Дудка, Н.А. Бисько, В.П. Билай. – К.: Урожай, 1992. – 160 с.
7. Приседський Ю.Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. – Донецьк: ДонНУ, 2005. – 75 с.
8. Рогожин В.В. Физиолого-биохимические механизмы прорастания зерновок пшеницы / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 8 (82). – С. 17–21.
9. Федотов О.В. Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз істівних лікарських грибів *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes* і *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов // Вісник Донецького університету. – 2006. – Вип. 2. – С. 270–274.
10. Федотов О.В. Зв'язані амінокислоти і білок ферментних препаратів монокозідальної дії у афілофорових грибів / О.В. Федотов, М.І. Бойко, С.Ф. Негруцький // Укр. ботан. журн. – 2002, – Т. 59, № 1. – С. 45–48.
11. Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького університету. – 2012. – Вип. 1. – С. 209–213.
12. Fedotov O.V. Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / O.V. Fedotov // Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications – Tbilisi: Myza, 2007. – P. 125–131.
13. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // Biol. Chem., 1951. – 193. – P. 265–275.
14. Ngo T.T. Peroxidase in chemical and biochemical analysis / T.T. Ngo // Analytical letters. – 2010. – Vol. 43, № 10. – P. 1572–1587.
15. Wasser S.P. Medicinal mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved problems / S.P. Wasser // International Journal Medical Mushrooms, 2010. – 12 (1). – P. 1–16.

Стаття надійшла до редакції 05.10.2013 р.

