

УДК 582.28:577.158

Т.Є. Волошко, О.В. Федотов

Донецький національний університет,
вул. Університетська, 24, Донецьк, 83000, Україна,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

ВПЛИВ ДЕЯКИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ БАЗИДІОМІЦЕТІВ

*Стаття присвячена вивченню впливу деяких мікроелементів на ріст та активність антиоксидантних оксидоредуктаз базидіальних грибів. Об'єктами дослідження були штами – активні продуценти оксидоредуктаз: *Agrocybe cylindracea* 167; *Pleurotus ostreatus* P-208 та *Fistulina hepatica* Fh-08. Для вивчення впливу мікроелементів на швидкість росту використовували ваговий метод визначення накопичення абсолютно сухої біомаси. Каталазну, пероксидазну та супероксиддисмутазну активності та вміст білку у міцелії і культуральному фільтраті визначали спектрофотометричними методами, на основі чого розраховували питому активність ферментів. Встановлено, що стимуляцію пероксидазної активності міцелію та культурального фільтрату штамів *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 спричиняє додавання Fe^{2+} у концентрації 8 та 1,6 мкмоль/л; а їх каталазної активності – Cu^{2+} та Mn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Підвищення у порівнянні з контролем каталазної активності штаму *A. cylindracea* 167 відбувається шляхом внесення до середовища Cu^{2+} та Zn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. При внесенні у живильне середовище сульфату Fe спостерігається незначна у порівнянні з контролем стимуляція супероксиддисмутазної активності штамів базидіомицетів. Результати дослідження показали взаємозв'язок між складом живильних середовищ та структурою, функцією і локалізацією ферментів та їх взаємодію.*

Ключові слова: базидіомицети, оксидоредуктази, регуляція активності, мікроелементи.

В останні десятиріччя спостерігається тенденція до пошуку шляхів використання базидіальних грибів як продуцентів біологічно активних речовин. Зокрема, як показала низка досліджень, базидіомицети здатні до активного синтезу ферментів, у тому числі і редокс-ензимів [5, 16, 17]. До таких окисно-відновних ферментів належать пероксидази (КФ 1.11.1.7), каталаза (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) та ін. Вони знайшли широке використання у різних галузях промисловості, науці та медицині, що зумовило підвищення попиту на їх ферментні препарати [1, 9, 11]. У зв'язку з цим розробка способів регуляції активності

© Т.Є. Волошко, О.В. Федотов, 2013



редокс-ферментів організмів-продуцентів є актуальним завданням сучасної біотехнології.

Встановлено, що гриби мають здатність до підвищеної сорбції та акумуляції мінеральних елементів субстрату [4, 8]. Внаслідок цього відбуваються значні зміни в процесах метаболізму грибного організму, в тому числі і в синтезі та активності ферментів [13]. Особливий інтерес має використання тих чи інших мікроелементів як компонентів живильних середовищ для культивування штамів базидіомицетів — продуцентів ферментів з метою регуляції їх метаболізму [4]. В цьому сенсі цікавим є залучення до середовищ Fe-, Cu-, Zn-, Mn-вмісних сполук, оскільки ці метали входять до активного центру ферментів: Fe або Mn — пероксидази, Fe — каталази, Cu, Zn або Mn — супероксиддисмутази [1, 9, 11].

Виходячи з вищезазначеного метою даної роботи було вивчення можливості регуляції активності оксидоредуктаз базидіомицетів за допомогою деяких мікроелементів.

Матеріали і методи

Як об'єкти дослідження використовували відібрані в попередніх роботах штами базидіомицетів — активні продуценти оксидоредуктаз [4]. Зокрема, як продуцент пероксидази обрано штам *Agrocybe cylindracea* 167; каталази — *Pleurotus ostreatus* P-208 та супероксиддисмутази — *Fistulina hepatica* Fh-08 [5]. Культури зберігаються у Колекції культур базидіомицетів кафедри фізіології рослин ДонНУ та депоновані у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК) [12].

Штами культивували поверхнево в колбах Ерленмейера на двох модифікаціях глюкозо-пептонного середовища. Так, живильне середовище № 1 (ЖС₁) 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 дистильована вода; а живильне середовище № 2 (ЖС₂) — для *P. ostreatus* P-208, склад якого ідентичний ЖС₁, але містило замість казеїну валін — 0,3 г/л. Склад середовищ базується на попередніх дослідженнях з оптимізації живильних середовищ для цих штамів [6]. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури штамів, що вирощувалися на сусло-агарі.

З метою вивчення шляхів регуляції активності оксидоредуктаз базидіомицетів за допомогою деяких мікроелементів до живильних середовищ додатково вносили сульфати Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} у концентраціях: 0,01%, 0,05% та 0,1% у кінцевому об'ємі середовища. Це відповідає вмісту Fe і Mn 1,6; 8 і 16 мкмоль/л та Cu і Zn 1,7; 8 і 17 мкмоль/л. Контролем (К) слугували 12-денні культури на ЖС₁ штамів *A. cylindracea* 167 і *F. hepatica* Fh-08 та ЖС₂ — штаму *P. ostreatus* P-208 без додаткового

внесення сполук металів. Культивування штамів проводили при 27 ± 1 °C протягом 12 діб.

Матеріалами досліджень слугували міцелії та культуральний фільтрат (КФ), які отримували при 5 ± 1 °C шляхом фільтрування культуральної рідини обраних штамів. Міцелії при $1 \pm 0,5$ °C промивали дистильованою водою, підсушували на фільтрувальному папері та гомогенізували. Гомогенат розбавляли дистильованою водою у співвідношенні 1:10 та центрифугували протягом 10 хвилин при 2000 g.

Активність оксидоредуктаз визначали спектрофотометричними методами. Пероксидазну активність (POX activity) визначали за інтенсивністю забарвлення продукту окислення о-діанізидину пероксидом водню та виражали в ум. од. кількості ферменту, яка каталізує окислення 1 мкмоль о-діанізидину за 1 хвилину [5]. Каталазну активність (CAT activity) визначали за забарвленням продукту реакції пероксиду водню з молібдатом амонію та виражали у мкат, що відповідає кількості ферменту, яка бере участь у перетворенні 1 мМ перекису водню за 1 секунду у заданих умовах [5]. Рівень супероксиддисмутази (SOD activity) оцінювали за здатністю цього ферменту інгібувати реакцію аутоокислення адреналіну в лужному середовищі, та виражали в ум. од., що відповідає 1% пригнічення швидкості аутоокиснення адреналіну під дією супероксиддисмутази (СОД) [5].

Абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію визначали ваговим методом [5]. Концентрацію білка в міцелії та культуральному фільтраті визначали за методом Лоурі-Фоліна [7].

На основі отриманих результатів розраховували питому пероксидазну, каталазну і 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 білку.

Отримані експериментальні дані піддавали статистичній обробці з метою встановлення вірогідності впливу факторів згідно керівництву [10]. Результати представлені у вигляді середніх значень із зазначенням середньої квадратичної помилки ($M \pm m$). Для оцінки статистичної значущості відмінностей використовували рівень вірогідності $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Результати низки досліджень впливу мікроелементів при їх спільному і окремому додаванні в живильне середовище вказують на їх регулювальну функцію на ріст та утворення метаболітів при культивуванні штамів грибів на різних поживних середовищах [3, 13]. Отже, на першому етапі досліджень ми вивчали вплив сполук Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} на рівень накопичення АСБ досліджуваними штамми базидіоміцетів (табл. 1).



Таблиця 1

Вплив мікроелементів на накопичення абсолютно сухої біомаси штамів базидіомицетів

Table 1

Influence of microelements on absolutely dry biomass of strains basidiomycetes

Метал	Концентрація, мкмоль/л	АСБ					
		Вміст, г/л	К % **	Вміст, г/л	К % **	Вміст, г/л	К % **
		Штам <i>A. cylindracea</i> 167		Штам <i>F. hepatica</i> Fh-08		Штам <i>P. ostreatus</i> P-208	
Fe ²⁺	1,6	3,12±0,06	99	3,46±0,08	102	4,02±0,06*	87
	8	3,07±0,04	97	3,42±0,09	101	3,92±0,05*	85
	16	2,81±0,06*	89	3,21±0,07*	95	3,81±0,05*	82
Zn ²⁺	1,7	3,37±0,07*	107	3,10±0,06*	91	4,55±0,06	98
	8	3,29±0,05*	104	2,94±0,03*	87	4,58±0,06	99
	17	3,05±0,05	97	2,61±0,04*	77	4,24±0,05*	92
Cu ²⁺	1,7	2,54±0,04*	80	3,04±0,03*	90	4,37±0,05*	94
	8	2,07±0,04*	66	3,57±0,07*	105	4,13±0,05*	89
	17	1,91±0,03*	60	2,77±0,03*	82	4,02±0,06*	87
Mn ²⁺	1,6	2,83±0,04*	90	3,31±0,04	98	4,41±0,06*	95
	8	2,59±0,05*	82	3,14±0,05*	93	4,33±0,04*	94
	16	2,11±0,03*	67	2,02±0,02*	60	4,09±0,05*	88
Контроль (0)		3,16±0,06	0	3,39±0,09	0	4,63±0,06	0

Примітка: * — різниця достовірна порівняно з контролем

** — співвідношення дослідного АСБ до АСБ на контрольному живильному середовищі у відсотках.

Встановлено, що в більшості дослідів (91,7% від їх загальної кількості) сульфати металів викликають пригнічення ростових процесів, що найбільше виражено для штамів *A. cylindracea* 167 при концентраціях Cu^{2+} 17 і 8 та Mn^{2+} 16 мкмоль/л і для штаму *F. hepatica* Fh-08 при концентрації Mn^{2+} 16 мкмоль/л. Для трьох варіантів досліду зафіксована незначна стимуляція накопичення АСБ. Так, підвищення АСБ у 7% відмічено при культивуванні штаму *A. cylindracea* 167 на середовищі, що містило Zn^{2+} у концентрації 1,7 мкмоль/л та дещо меншу — у 4% при концентрації цього металу 8 мкмоль/л. Також відмічено незначне зростання накопичення біомаси при культивуванні штаму *F. hepatica* Fh-08 на середовищі, що містило Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Отже, застосовані сполуки металів у цих концентраціях в більшості випадків гальмують ріст міцелію досліджуваних штамів. Це збігається з низкою досліджень, результати яких показують, що ці метали можуть викликати або зниження, або прискорення росту та метаболічних процесів культур грибів [4, 14, 15].

Виходячи з того, що іони металів Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} наявні в активних центрах досліджуваних ферментів, наступним етапом вивчали вплив обраних речовин на активність оксидоредуктаз. Результати цих досліджень представлені у табл. 2–4.

Аналіз результатів цих досліджень показує відсутність закономірності щодо впливу металів на пероксидазну активність, яка залежить як від їх концентрації, так і від штаму гриба. Так, підвищення порівняно з контролем РОХ activity міцелію зафіксовано в 66,7%, а КФ — у 50% дослідів.

Найвищий рівень індукції у 4,6 разу спостерігали для штаму *P. ostreatus* P-208, який культивували на середовищі з Fe^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Далі за рівнем підвищення РОХ activity міцелію цього штаму йде Cu^{2+} у тій же концентрації та Fe^{2+} у концентрації 1,6 мкмоль/л, яка перевищує РОХ activity контролю у 4,0 та 3,5 рази відповідно. Така ж тенденція, з більш низькими значеннями стимуляції зареєстрована для КФ цього штаму, яка складала 2,3; 2,1 та 1,8 рази відповідним металам і їх концентраціям. Для штаму *A. cylindracea* 167 відмічено найвище значення стимуляції РОХ activity міцелію при його культивуванні на середовищі з Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л, яке у 3,7 разу перевищувало цей показник контролю. Дещо нижчі показники підвищення РОХ activity міцелію у 3,1 разу та КФ — у 1,5 рази зафіксовано при культивуванні цього штаму на середовищі з Zn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Штам *F. hepatica* Fh-08 має найвищий рівень стимуляції РОХ activity при його культивуванні на середовищі з Fe^{2+} у концентраціях 8 та 1,6 мкмоль/л, який у міцелії дорівнює 2-м, а у КФ — 3-м.

Максимальне пригнічення РОХ activity як в міцелії так і в КФ зафіксовано у всіх досліджених штамів, що росли на середовищах з Mn^{2+} у концентрації 16 мкмоль/л. Для штаму *P. ostreatus* P-208 таке зниження



Таблиця 2

Вплив мікроелементів на пероксидазну активність штамів базидіомицетів

Table 2

Influence of microelements on peroxidase activity of strains basidiomycetes

Метал	С, мкмоль/л	РОХ activity _{тр} , ум.од. / мг білку														
		Міцелій	Σ ** %	КФ	Σ ** %	Міцелій	% К **	КФ	% К **	Міцелій	% К **	КФ	Σ ** %			
		Штам <i>A. cylindracea</i> 167					Штам <i>F. hepatica</i> Fh-08					Штам <i>P. ostreatus</i> P-208				
	1,6	3,41±0,02*	113	10,96±0,05*	107	0,70±0,01*	194	3,70±0,03*	294	2,34±0,02*	349	0,68±0,01*	213			
Fe ²⁺	8	7,48±0,03*	248	9,04±0,04*	89	0,72±0,02*	200	3,78±0,02*	300	3,05±0,03*	455	0,74±0,01*	231			
	16	6,14±0,03*	203	8,53±0,04*	84	0,52±0,01*	144	1,11±0,01*	88	2,21±0,02*	330	0,56±0,01*	175			
	1,7	7,29±0,03*	241	10,34±0,03	101	0,54±0,02*	150	2,01±0,02*	160	0,67±0,01	100	0,43±0,01*	134			
Zn ²⁺	8	9,48±0,03*	314	15,36±0,06*	150	0,61±0,02*	169	2,18±0,02*	173	0,69±0,01	103	0,49±0,01*	153			
	17	1,94±0,02*	64	11,47±0,06*	112	0,49±0,01*	136	1,96±0,02*	156	0,65±0,01	97	0,31±0,01	97			
	1,7	7,34±0,06*	243	9,97±0,04*	98	0,36±0,01	100	1,14±0,02*	90	1,31±0,02*	196	0,49±0,02*	153			
Cu ²⁺	8	11,01±0,07*	365	9,63±0,03*	94	0,34±0,01*	94	1,26±0,01	100	2,68±0,02*	400	0,57±0,02*	178			
	17	2,87±0,02*	95	4,05±0,02*	40	0,21±0,02*	58	1,09±0,01*	87	1,27±0,01*	190	0,28±0,01*	88			
	1,6	6,21±0,04*	206	8,02±0,03*	79	0,46±0,02*	128	1,39±0,02*	110	0,50±0,02*	75	0,21±0,01*	66			
Mn ²⁺	8	6,96±0,05*	230	8,43±0,03*	83	0,41±0,01*	114	1,33±0,02*	106	0,44±0,01*	66	0,17±0,01*	53			
	16	2,27±0,02*	75	6,12±0,05*	60	0,24±0,01*	67	0,98±0,01*	78	0,32±0,01*	48	0,12±0,01*	38			
K (0)		3,02±0,04	0	10,21±0,04	0	0,36±0,01	0	1,26±0,02	0	0,67±0,01	0	0,32±0,01	0			

Примітка: * — різниця достовірна порівняно з контролем

** — співвідношення дослідного РОХ activity_{тр} до РОХ activity_{тр} на контрольному живильному середовищі у %.

характерне і при концентрації Mn^{2+} 8 мкмоль/л. При культивуванні на середовищах з Cu^{2+} у концентрації 17 мкмоль/л, встановлено два випадки суттєвого зниження POX activity: міцелію для штаму *A. cylindracea* 167 та КФ — штаму *F. hepatica* Fh-08. Щодо середовищ з Zn^{2+} , то максимальне зниження POX activity міцелію тут відмічене для штаму *A. cylindracea* 167 при концентрації у 17 мкмоль/л.

Отже, з метою стимуляції пероксидазної активності міцелію та КФ штамів *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 є доцільним використання Fe^{2+} у концентрації 8 та 1,6 мкмоль/л. Це пояснюється тим, що грибна лігнінпероксидаза містить в активному центрі іон Fe^{3+} [1].

Аналіз даних з впливу задіяних металів на каталазну активність штамів базидіоміцетів показав підвищення цього показника в міцелії у 63,9% та у КФ — у 55,6% дослідів.

Максимальна стимуляція CAT activity у 2,4 разу зафіксована для міцелію штаму *P. ostreatus* P-208, який культивували на середовищах з Mn^{2+} та Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л, а дещо нижча у 2,2 разу — з Mn^{2+} у 1,6 мкмоль/л. Та ж закономірність спостерігається для КФ цього штаму з індукцією у 1,2 та 1,1 разу відповідно. Для штаму *A. cylindracea* 167 характерна індукція CAT activity КФ в 1,8 разу на середовищах з Cu^{2+} у концентрації 8 і 17 мкмоль/л та міцелію — в 1,2 разу — з Zn^{2+} 8 та 17 мкмоль/л. Культура *F. hepatica* Fh-08 має найвищі значення CAT activity міцелію на середовищі з Cu^{2+} 8 та 17 мкмоль/л та Mn^{2+} 1,6 мкмоль/л, індукція тут складає 1,1. Щодо індукції CAT activity КФ штаму *F. hepatica* Fh-08, то найвищі значення у 1,3 разу вищі за контроль спостерігалися при культивуванні його на середовищах з Mn^{2+} та Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л.

Зниження відносно контролю каталазної активності досліджуваних штамів спостерігали за різних концентрацій металів. Так, при культивуванні штаму *A. cylindracea* 167 на середовищі з Mn^{2+} 16 мкмоль/л зафіксована його найнижча CAT activity як в міцелії, так і в КФ. Штами *F. hepatica* Fh-08 (міцелій та КФ) і *P. ostreatus* P-208 (КФ) мали найнижчу CAT activity при культивуванні на живильному середовищі з Fe^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л.

Отже, з метою підвищення каталазної активності міцелію та КФ штамів *P. ostreatus* P-208 і *F. hepatica* Fh-08 виправдане внесення у живильне середовище Cu^{2+} та Mn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л; а штаму *A. cylindracea* 167 — Cu^{2+} (КФ) та Zn^{2+} (міцелій) у концентрації 8 мкмоль/л. Ці результати, можна пояснити взаємодією досліджуваних ферментів. Так, підвищення CAT activity є наслідком підвищення SOD activity, що зафіксовано в дослідях (табл. 4).

Вивчення впливу обраних сульфатів металів на супероксиддисмутазну активність деяких штамів базидіоміцетів показало незначну стимуляцію цього показника в міцелії у 47,2% та у КФ — у 36,1% дослідів.



Вплив мікроелементів на каталазну активність штамів базидіомицетів

Table 3

Influence of microelements on catalase activity of strains basidiomycetes

Метал	С, мкмоль/л	САТ activity _{тр} , мкат / мг білку											
		Міцелій	** К %	КФ	** К %	Міцелій	** К %	КФ	** К %	Міцелій	** К %	КФ	** К %
Fe ²⁺	1,6	Штам <i>A. cylindracea</i> 167						Штам <i>P. ostreatus</i> P-208					
		49,61±0,08*	105	141,09±0,18*	106	94,88±0,09*	70	102,62±0,09*	74	51,08±0,07	103	953,33±1,01*	99
		52,63±0,08*	111	147,72±0,23*	111	92,31±0,08*	68	97,24±0,10*	70	54,19±0,07*	109	355,94±0,51*	37
Zn ²⁺	16	48,97±0,07*	103	143,87±0,20*	108	96,91±0,08*	71	108,12±0,10*	78	50,92±0,07	103	412,72±0,60*	43
		51,16±0,07*	108	144,92±0,16*	109	123,58±0,09*	91	144,36±0,10*	104	53,72±0,08*	108	829,39±0,84*	86
		58,21±0,08*	123	141,67±0,15*	107	127,80±0,10*	94	142,14±0,16	102	53,68±0,07*	108	741,87±0,53*	77
Cu ²⁺	17	56,35±0,08*	119	130,69±0,12	98	118,55±0,09*	87	139,11±0,15	100	50,31±0,07	101	529,48±0,47*	55
		47,24±0,07	100	212,06±0,16*	160	139,46±0,11	103	141,88±0,16	102	23,66±0,05*	48	966,32±0,97	100
		52,66±0,08*	111	241,72±0,16*	182	152,91±0,11*	113	173,78±0,15*	125	118,76±0,09*	239	1092,01±1,14*	113
Mn ²⁺	17	52,81±0,07*	111	239,88±0,18*	180	146,24±0,15*	108	148,11±0,15*	107	101,29±0,09*	204	1007,71±1,09*	104
		42,34±0,06*	89	113,32±0,12*	85	148,64±0,14*	109	150,10±0,17*	108	107,83±0,08*	217	1098,99±0,95*	114
		40,02±0,06*	84	88,63±0,10*	67	143,67±0,12*	106	173,78±0,16*	125	121,18±0,09*	244	1124,66±1,21*	117
K (0)	16	36,97±0,06*	78	46,21±0,09*	35	135,91±0,12	100	131,55±0,16*	95	96,47±0,07*	194	993,76±0,91*	103
		47,37±0,10	0	132,95±0,21	0	135,84±0,20	0	139,06±0,23	0	49,67±0,08	0	964,81±0,93	0

Примітка: * — різниця достовірна порівняно з контролем

** — співвідношення дослідного САТ activity_{тр} до САТ activity_{тр} на контрольному живильному середовищі у %.

Таблиця 4
Table 4

Вплив мікроелементів на супероксиддисмутазну активність штамів базидіоміцетів

Influence of microelements on superoxide dismutase activity of strains basidiomycetes

Метал	С, мкмоль/л	SOD activity _{пт} , ум.од. / мг білку														
		Міцелій	КФ	К	% **	Міцелій	КФ	К	% **	Міцелій	КФ	К	% **			
		Штам <i>A. cylindracea</i> 167					Штам <i>F. hepatica</i> Fh-08					Штам <i>P. ostreatus</i> P-208				
Fe ²⁺	1,6	6,90±0,05*	132	48,09±0,07*	98	36,44±0,05*	126	128,16±0,10	102	7,93±0,07*	120	40,03±0,07*	116			
	8	7,11±0,05*	136	50,18±0,08	103	32,11±0,04*	111	138,00±0,12*	110	8,22±0,07*	124	38,88±0,08*	113			
Zn ²⁺	16	6,63±0,05*	127	46,47±0,07*	95	30,03±0,05*	103	127,05±0,11	101	7,95±0,08*	120	35,12±0,09*	102			
	1,7	6,19±0,04*	119	51,21±0,08*	105	30,21±0,05*	104	124,48±0,12	99	8,20±0,07*	124	37,86±0,08*	110			
Cu ²⁺	8	6,01±0,04*	115	51,14±0,08*	104	34,81±0,06*	120	110,65±0,10*	88	8,21±0,08*	124	39,49±0,09*	114			
	17	5,00±0,03*	96	45,36±0,07*	93	26,18±0,04*	90	125,12±0,12	100	7,73±0,06*	124	36,21±0,07*	105			
Mn ²⁺	1,7	4,67±0,03*	89	49,39±0,07	101	23,41±0,05*	81	101,24±0,11*	81	5,21±0,05*	79	33,62±0,07*	97			
	8	4,24±0,03*	81	48,48±0,08	99	19,32±0,04*	67	90,80±0,10*	72	4,93±0,05*	75	33,93±0,08	98			
K	17	4,09±0,02*	78	48,22±0,06	99	20,08±0,05*	69	88,19±0,11*	70	4,29±0,03*	65	34,14±0,07	99			
	1,6	3,06±0,02*	59	46,03±0,07*	94	29,90±0,05*	103	110,61±0,12*	88	1,30±0,02*	20	21,96±0,05*	64			
K (0)	8	2,37±0,01*	45	45,31±0,07*	93	27,16±0,06*	94	104,65±0,12*	83	1,18±0,03*	18	21,13±0,07*	61			
	16	2,18±0,01*	42	45,99±0,07*	94	22,33±0,04*	77	100,07±0,10*	80	1,05±0,02*	16	21,09±0,08*	61			
		5,22±0,05	0	48,95±0,09	0	29,02±0,06	0	125,58±0,12	0	6,61±0,05	0	34,55±0,06	0			

Примітка: * – різниця достовірна порівняно з контролем

** – співвідношення дослідного SOD activity_{пт} до SOD activity_{пт} на контрольному живильному середовищі у %.

Найвищу стимуляцію SOD activity дали середовища з Fe^{2+} : в концентрації 8 мкмоль/л в міцелії штамів *A. cylindracea* 167 і *P. ostreatus* P-208 — в 1,4 і 1,2 рази відповідно та в КФ *F. hepatica* Fh-08 — 1,1 разу, а також в концентрації 1,6 мкмоль/л в міцелії штаму *F. hepatica* Fh-08 — 1,3 разу і в КФ штаму *P. ostreatus* P-208 — в 1,2 разу. Слід відзначити, що для останнього штаму гливи звичайної таке ж підвищення SOD activity міцелію зафіксоване на середовищах з Zn^{2+} у всіх концентраціях.

Найнижчі значення SOD activity міцелію показали штами *P. ostreatus* P-208 і *A. cylindracea* 167 при культивуванні на середовищах з Mn^{2+} у концентраціях 8 і 16 мкмоль/л. На цих же середовищах також спостерігалася значна репресія SOD activity КФ штаму *P. ostreatus* P-208. Для штаму *F. hepatica* Fh-08 відмічені найнижчі значення цієї активності як в міцелії так і в КФ на середовищах з Cu^{2+} у концентрації 8 і 17 мкмоль/л.

Отже, сульфати Fe^{2+} та Zn^{2+} як компоненти живильного середовища викликають несуттєве підвищення SOD activity досліджуваних штамів базидіомицетів, що не перевищує 1,4 рази в порівнянні з контролем; а сполуки Cu^{2+} і Mn^{2+} спричиняють зниження цього показника в переважній більшості дослідів. Отримані результати можна пояснити таким чином: цинк входить до активного центру цитозольної СОД, а залізо міститься в СОД мітохондрій та пероксисом, а отже додаткове окреме внесення сульфату цих металів до живильного середовища викликає підвищення активності цього ензиму. Внесення до живильного середовища сульфатів міді чи марганцю веде до зниження SOD activity внаслідок токсичної дії застосованих концентрацій цих металів. Останнє припущення підтверджується зниженням накопичення біомаси досліджуваними штамми на цих варіантах живильних середовищ порівняно з контролем.

Таким чином, вивчена можливість регуляції росту і активності оксидоредуктаз деяких штамів базидіомицетів шляхом внесення до складу живильного середовища сульфатів Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} в певних концентраціях. Зокрема, з метою стимуляції пероксидазної активності міцелію та КФ штамів *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 є доцільним використання Fe^{2+} у концентрації 8 та 1,6 мкмоль/л; а їх каталазної активності — Cu^{2+} та Mn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Для підвищення САТ activity штаму *A. cylindracea* 167 можна рекомендувати внесення до середовища Cu^{2+} та Zn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. При внесенні у живильне середовище сульфатів Fe^{2+} та Zn^{2+} спостерігається незначна стимуляція SOD activity штамів базидіомицетів. Результати дослідження показали взаємозв'язок між складом живильних середовищ та структурою, функцією і локалізацією ферментів та їх взаємодію. Так, при підвищенні SOD activity у клітині накопичується перекис водню що викликає у відповідь підвищення САТ activity. Наприкінці процесу каталізу, при низьких концентраціях перекису водню каталаза внаслідок низької спорідненості до субстрату втрачає активність, а пероксидаза — навпаки зростає.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Айзенштадт М.А., Боголицын К.Г. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // Химия растительного сырья. — 2009. — № 2. — С. 5–18.
2. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. — 2006. — Т. 48, № 6. — С. 465–474.
3. Баринова К.В., Власов Д.Ю., Щипарев С.М. Влияние цинка и меди на рост и ацидофицирующую активность гриба *Penicillium citrinum* в условиях культуры // Микология и фитопатология. — 2012. — Т. 46, № 6. — С. 385–389.
4. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов / З.Э. Беккер. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. — 230 с.
5. Волошко Т.Є., Федотов О.В. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз // Мікробіологія і біотехнологія. — Одеса: ОНУ ім. І.І. Мечникова. — 2011. — №. 4(16). — С. 69–81.
6. Волошко Т.Є., Федотов О.В. Вплив джерел азотного живлення на активність оксидоредуктаз деяких штамів базидіоміцетів // Актуальні проблеми ботаніки та екології / Матер. міжнародної конф. молодих учених (Ужгород 19-23 вересня 2012) — Ужгород, 2012. — С. 197–198.
7. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. Справочник биохимика — М.: Мир, 1991. — 544 с.
8. Иванов А.И., Костычев А.А., Скобанев А.В. Аккумуляция тяжелых металлов и мышьяка базидиомами макромицетов различных экологотрофических и таксономических групп // Поволжский экологический журнал. — 2008. — № 3. — С. 190–199.
9. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы // Биополимеры и клетка. — 1992. — Т. 8, № 6. — С. 3–25.
10. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
11. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. — СПб: ГИОРД, 2004. — 240 с.
12. Федотов О.В., Чайка О.В., Волошко Т.Є., Велигодська А.К. Колекція культур шапинкових грибів — основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів // Вісник Донецького національного університету. — 2012. — № 1. — С. 209–213.
13. Gbolagade J.S. The effect of different nutrient sources on biomass production of *Lepiota procera* in submerged liquid cultures // African Journal of Biotechnology. — 2006. — Vol. 5(12). — P. 1246–1249.
14. Hartikainen E.S., Lankinen P., Rajasarkka J. Impact of copper and zinc on the growth of saprotrophic fungi and the production of extracellular enzymes // Boreal environment research. — 2012. — № 17. — P. 210–218.



15. Stajic M., Vukojevic J., Duletic-Lausevic S. Influence of the cultivation conditions on ligninolytic enzyme production in *Pleurotus pulmonarius* // Zbornik Matice srpske za prirodne nauke. — 2007. — № 113. — P. 303–312.

16. Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — 89. — P. 1323–1332.

17. Wasser S.P., Sytnik K.M., Buchalo A.S., Solomko E.F. Medicinal mushrooms: Past, present and future // Ukrainian Botanical Journal. — 2002. — 59(5). — P. 499–524.

Стаття надійшла до редакції 06.02.2013 р.

Т.Е. Волошко, О.В. Федотов

Донецкий национальный университет,
ул. Университетская, 24, Донецк, 83000, Украина,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Реферат

Статья посвящена изучению влияния некоторых микроэлементов на рост и активность антиоксидантных оксидоредуктаз базидиальных грибов. Объектами исследования были штаммы — активные продуценты оксидоредуктаз: *Agrocybe cylindracea* 167; *Pleurotus ostreatus* P-208 и *Fistulina hepatica* Fh-08. Для изучения влияния микроэлементов на скорость роста использовали весовой метод определения накопления абсолютно сухой биомассы. Каталазную, пероксидазную и супероксиддисмутазную активности и содержание белка в мицелии и культуральном фильтрате определяли спектрофотометрическими методами, на основе чего рассчитывали удельную активность ферментов. Установлено, что стимуляцию пероксидазной активности мицелия и культурального фильтрата штаммов *P. ostreatus* P-208 и *F. hepatica* Fh-08 вызывает добавление Fe^{2+} в концентрации 8 и 1,6 мкмоль / л, а их каталазной активности — Cu^{2+} и Mn^{2+} в концентрации 8 мкмоль/л. Повышение по сравнению с контролем каталазной активности штамма *A. cylindracea* 167 происходит путем внесения в среду Cu^{2+} и Zn^{2+} в концентрации 8 мкмоль/ л. При внесении в питательную среду сульфата Fe наблюдается незначительная по сравнению с контролем стимуляция супероксиддисмутазной активности штаммов базидиомицетов. Результаты исследования



показали взаимосвязь между составом питательных сред и структурой, функцией, локализацией ферментов и их взаимодействие.

Ключевые слова: базидиомицеты, оксидоредуктазы, регуляция активности, микроэлементы.

T. Voloshko, O. Fedotov

Donetsk National University
24, University St., Donetsk 83000, Ukraine
tel.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

INFLUENCE OF SOME MICROELEMENTS ON BASIDIOMYCETES OXIDOREDUCTASES ACTIVITY

Summary

The article is devoted to the influence of some microelements on the growth and activity of antioxidant oxidoreductase of basidiomycetes. The objects of the study were strains — active producers of oxidoreductases: *Agrocybe cylindracea* 167; *Pleurotus ostreatus* P-208 and *Fistulina hepatica* Fh-08. The weighting method of determination of accumulation of absolutely dry biomass was used to study the influence of some microelements on the growth. Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activity and protein content of mycelium and culture filtrate was determined by spectrophotometric methods, and the specific activity of enzymes were calculated. A significant effect of Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} on the level of accumulation of absolutely dry biomass, catalase, peroxidase and superoxide dismutase activity was estimated. It was found that the stimulation of peroxidase activity in mycelia and culture filtrate of the strains *P. ostreatus* P-208 and *F. hepatica* Fh-08 caused by the addition of Fe^{2+} in the concentration of 8 and 1.6 mmol / l, and the stimulation of their catalase activity caused by the addition of Cu^{2+} and Mn^{2+} in the concentration of 8 mmol / l. Increased catalase activity of strain *A. cylindracea* 167 caused by amending Cu^{2+} and Zn^{2+} in the concentration of 8 mmol / l in the medium. There was a slight stimulation of superoxide dismutase activity of the strains of basidiomycetes caused by addition of ferrous sulphate in the nutrient medium. The results of the study showed the relationship between the composition of culture media and the structure, function and localization of enzymes and their interaction

Key words: basidiomycetes, oxidoreductase, regulation of the activity, microelements.

