

**О.В. Чайка, О.В. Федотов**

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

## **РІСТ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ШТАМУ *PLEUROTUS OSTREATUS* P-107**

*Досліджено динаміку накопичення біомаси та вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), активних до тіобарбітурової кислоти, у міцелії та культуральному фільтраті штаму P-107 гливи *Pleurotus ostreatus*, що культивували на глюкозо-пептонному та стандартному синтетичному живильних середовищах. Встановлено, що більше накопичення біомаси та менша концентрація продуктів ПОЛ притаманні культурі, що росла на глюкозо-пептонному середовищі. На обох середовищах виявлені подібні закономірності динаміки вмісту продуктів ПОЛ.*

*Ключові слова: базидіоміцети, перекисне окиснення ліпідів, живильні середовища.*

Останнім часом швидко зростає інтерес до промислового грибівництва та біотехнологій отримання біологічно активних речовин (БАР) грибного походження. Ксилотрофний базидіоміцет глива звичайна *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kunt. займає одне з провідних місць у світі за загальною кількістю виробленої грибною продукції [5, 11]. Культури *P. ostreatus* здатні рости на доступних та малоцінних субстратах, виявляють стійкість до шкідників і хвороб тощо [3, 5, 11]. Встановлено, що цей гриб має високу біологічну цінність і лікувально-профілактичні властивості та є продуцентом різноманітних біологічно активних речовин. Багато з них виявляють фармакологічну активність та мають антиоксидантну, антивірусну, протипухлинну, антифунгальну, радіопротекторну і імуномодельовальну лікарську дію [1, 4, 11, 12]. Порівняно з продуктами хімічного синтезу препарати з гливи звичайної є менш токсичними і ефективнішими при застосуванні у медичній практиці [1, 9, 12].

Найголовнішою умовою належного росту, функціонування та біосинтетичної активності живих організмів є сталість внутрішнього середовища — гомеостаз. Його складовою частиною є динамічна рівновага між активацією та інгібуванням процесів вільнорадикального окиснення,



зокрема, перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Отже, ПОЛ є необхідним метаболічним процесом, що підтримується на стабільному рівні завдяки жорсткому контролю багаторівневого антиоксидантного захисту [2, 13]. Окрім того, гриби, зокрема ксилотрофні макроміцети, мають здатність до ініціювання реакцій ПОЛ, які спрямовані на вільнорадикальне розкладання лігніну і інших феноловмісних речовин, що має суттєве адаптаційне та екологічне значення [8].

Порушення рівноваги у системі окиснення-антиокиснення та активізація процесів ПОЛ має суттєве значення за багатьох станів і процесів, розвитку і наслідків дії на організм різноманітних факторів довкілля [2, 13, 14].

Таким чином, дані про вміст продуктів ПОЛ у біологічному матеріалі можуть надати інформацію про стан життєдіяльності об'єкта. Як кількісні маркери інтенсивності ПОЛ найчастіше використовується один з його кінцевих продуктів — малоновий діальдегід (МДА).

Метою роботи було вивчення росту та інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 (Jacq.: Fr.) Kunt.

### Матеріали і методи

Об'єкт дослідження — штам *Pleurotus ostreatus* P-107, виділений з дикоростучих плодових тіл, зібраних в НПП «Святі Гори» та депонований у колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України.

Інтродукований штам P-107, що має порівняно високі ростові та біосинтетичні характеристики, культивували при температурі 27,5 °С в колбах Ерленмейера ємністю 250 мл на глюкозо-пептонному (ГПС) та стандартному синтетичному (СС) живильних середовищах об'ємом 50 мл. Живильні середовища мали такий склад (г/л): ГПС — глюкоза — 10,0; пептон — 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{CaCl}_2$  — 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001; СС — глюкоза — 10;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 2,3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{CaCl}_2$  — 0,1;  $\text{FeSO}_4$  — 0,02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,02;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,02 [3]. Інокулюмом був вегетативний міцелій штаму P-107 розміром 5×5 мм, який ріс 7–10 діб на 4° за Баллінгом сусло-агарі. Термін культивування — 15 діб. Матеріалами для досліджень слугували гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ). Для одержання гомогенату міцелію температуру зразка доводили до  $5 \pm 1$  °С. Міцелій відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування через фільтрувальний папір. Отриманий міцелій додатково промивали у дистильованій воді та підсушували на фільтрувальному папері і охолоджували до  $0 \pm 1$  °С. Підготовлений міцелій гомогенізували шляхом розтирання у ступці. Осад відділяли центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при  $5 \pm 1$  °С, відцентровому прискоренні 2000 g протягом 15 хвилин. Дослідження провадили на 6-ту, 9-ту, 12-ту та 15-ту



добу культивування штаму Р-107. Вони включали визначення вмісту продуктів ПОЛ [7], сирої та сухої біомаси міцелію ваговим методом; рН культурального фільтрату потенціометричним методом на рН-метрі 150 МИ; вміст білка на спектрофотометрі СФ-26 за методом Варбурга—Христіана [6]. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів у міцелії та культуральному фільтраті визначали за вмістом продуктів ПОЛ, активних до тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП), з використанням модифікованого методу [7]. В основі методу лежить реакція між малоновим дільдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), що веде до утворення забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 535 нм.

Досліди проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані обробляли з використанням програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності  $P > 0,95$  [10].

### Результати та їх обговорення

Одним із показників придатності живильного середовища до культивування штамів базидіоміцетів є накопичення біомаси міцелію. Проведені дослідження показали (рис. 1), що під час культивування штаму Р-107 на ГПС спостерігалася стрімке накопичення біомаси протягом усього періоду культивування, яке досягло на 15-ту добу максимальних значень 142,48 г/л, що складає 3,28 г/л у перерахунку на суху біомасу.

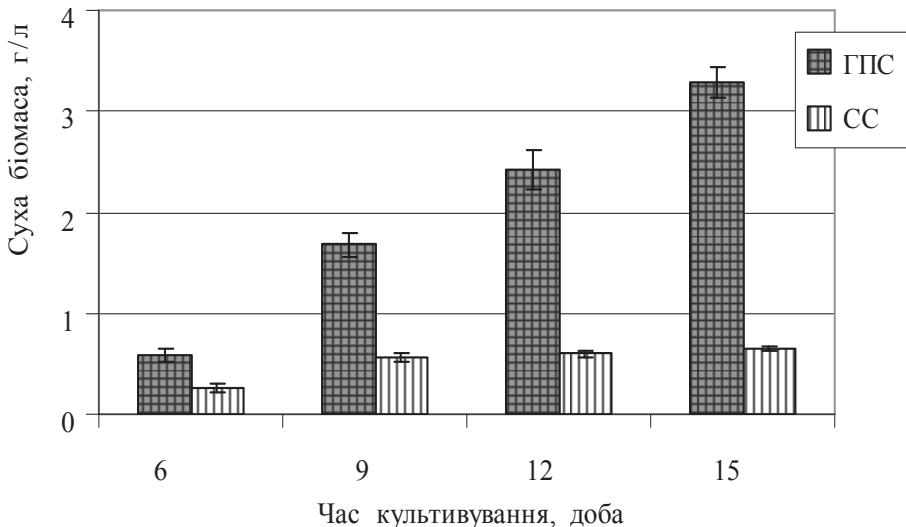


Рис. 1. Накопичення біомаси штамом Р-107 на ГПС та СС

Fig. 1. Accumulation of biomass by strain P-107 on GPM and SM

Спостерігали і культурально-морфологічні відмінності міцелію на застосованих середовищах: міцелій на СС, у порівнянні з ГПС, був менш щільний та переважно занурений у культуральну рідину. Гальмування росту штаму на СС, вірогідно, пояснюється зниженням концентрації необхідних для росту компонентів середовища, в тому числі і сполук Нітрогену, накопиченням продуктів обміну та, як наслідок, обмеженістю поживних речовин в клітинах штаму.

Стосовно зміни рН КФ можна зазначити, що водневий показник обох живильних середовищ протягом терміну культивування поступово знижувався. На ГПС, вихідне рН якого дорівнювало 6,49 од., водневий показник знизився до 5,05 од. на 15-ту добу культивування, причому більш інтенсивно це відбувалося на 12–15-ту добу культивування. На СС було відмічене поступове зниження рН з початкового рівня 4,45 од. до 3,25 од. на 15-ту добу росту. Це, ймовірно, пов'язано з біосинтетичними властивостями штаму Р-107 – синтезом метаболітів кислоти природи та зміною складу середовища.

Аналіз динаміки вмісту білка у культуральній рідині показав, що ( $p \leq 0,05$ ) при культивуванні штаму Р-107 на ГПС вміст білка з початкового рівня 1,43 мг/мл незначно зменшився до 1,11 мг/мл на 12-ту добу з подальшим підвищенням до рівня 1,49 мг/мл на 15-ту добу. Це, ймовірно, пояснюється тим, що на початку культивування процеси синтезу екзоферментів та розкладу білкових речовин у КФ врівноважені. Також треба врахувати, що низький рівень накопичення біомаси на початку культивування обумовлює незначний синтез цих ферментів. Подальше культивування веде до зміщення рівноваги на користь розкладу білка. На 15-ту добу, ймовірно, на фоні виникнення дефіциту поживних речовин, відбувається посилення синтезу екзоферментів, що призводить до підвищення вмісту білка у КФ наприкінці культивування. У складі синтетичного живильного середовища білкові сполуки відсутні. Під час культивування штаму Р-107 на СС, концентрація білку з нульового рівня на початку культивування поступово збільшувалася до 0,07 мг/мл на 12-ту добу, що становило максимум, і незначно знижувалася наприкінці ферментації до 0,05 мг/мл. Ця динаміка пов'язана, можливо, із синтезом позаклітинних ферментів, що забезпечують процеси живлення.

Аналіз даних інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів у міцелії досліджуваного штаму Р-107 (рис. 2) дозволяє зазначити, що вміст продуктів ПОЛ виявився значно вищим у тих зразках, що зростали на синтетичному живильному середовищі, однак можна відмітити подібність у динаміці вмісту малонового діальдегіду в міцелії на обох середовищах. Рівень ПОЛ на початок росту культури не визначали, оскільки кількість інокулюму є недостатньою для проведення дослідів.



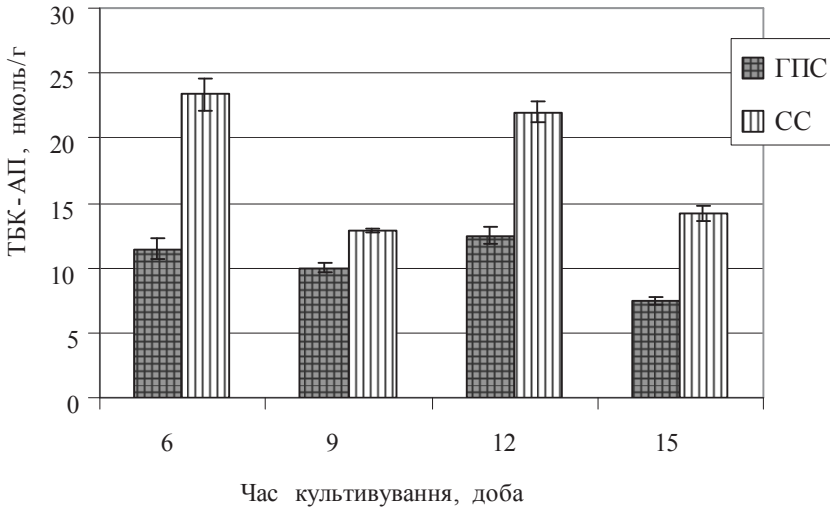


Рис. 2. Вміст ТБК-АП у міцелії штаму P-107 під час культивування на ГПС та СС

Fig. 2. Content of TBARS in strain P-107 mycelium during cultivation on GPM and SM

Вміст ТБК-АП у міцелії досліджуваного штаму *P. ostreatus* P-107, що ріс на ГПС, мав два максимуми на 6-ту та 12-ту добу культивування — 11,5 та 12,5 нмоль/г, відповідно. Мінімальний вміст ТБК-АП зафіксовано на 15-ту добу — 7,5 нмоль/г.

При культивуванні штаму P-107 на СС, як і на ГПС, найбільший вміст ТБК-АП у міцелії спостерігався на 6-ту і 12-ту добу росту. На 6-ту добу він становив 23,4 нмоль/г, а на 12-ту — 22,0 нмоль/г. Найнижчі показники інтенсивності ПОЛ були відмічені на 9-ту та 15-ту добу (12,9 та 14,2 нмоль/г, відповідно). Отже, на обох живильних середовищах були відмічені два максимуми рівня вмісту продуктів ПОЛ у міцелії — на 6-ту та 12-ту добу ферментації. Виходячи з рис. 2, 9-та та 15-та доба за вмістом ТБК-АП не мають достовірних розбіжностей для СС. Теж саме спостерігається і у випадку для ГПС для значень 6-тої, 9-тої і 12-тої доби. Це пояснюється тим, що на відміну від ГПС, СС містить солі феруму (II) і марганцю (II). По мірі їх надходження до клітин гриба збільшується швидкість утворення гідроксильних радикалів та інших активних форм кисню, тобто інтенсивність процесів ПОЛ.

Дереворуйнівні міцеліальні гриби, що викликають білу гниль деревини, є основними деструкторами лігніну в природі. Для руйнування цього полімеру, лігнотрофи утворюють декілька типів вільних радикалів, завдяки чому запускається ланцюг спонтанних деградаційних реакцій [8].

Вміст продуктів ПОЛ у КФ (рис. 3) більше як у два рази нижчий, ніж у міцелії. Як видно з графіку, максимальні значення вмісту продуктів ПОЛ в КФ на обох середовищах набувають на початку культивування

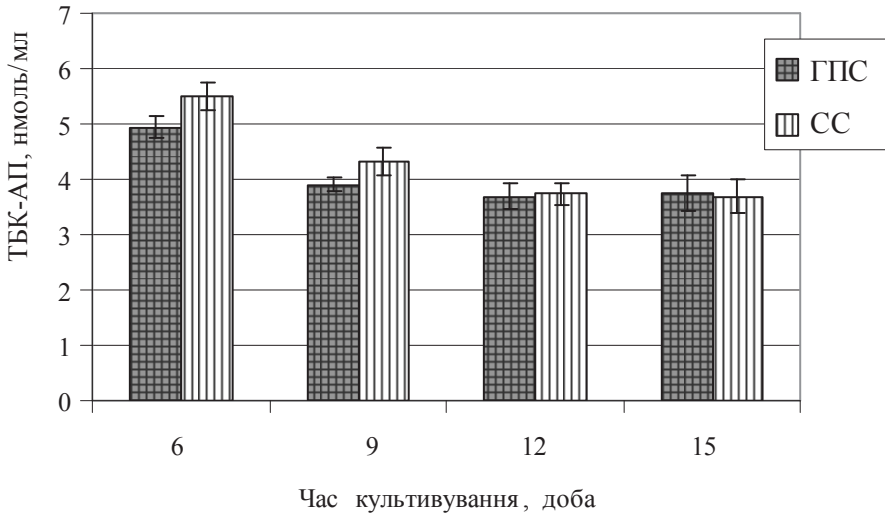


Рис. 3. Вміст ТБК-АП у культуральному фільтраті штаму P-107 під час культивування на ГПС та СС

Fig. 3. Content of TBARS in strain P-107 culture broth during cultivation on GPM and SM

(4,9 нмоль/мл в ГПС та 5,5 нмоль/мл у СС). На 15-ту добу ферментації ці показники склали 3,8 нмоль/мл (ГПС) та 3,7 нмоль/мл (СС). Очевидна подібність динаміки вмісту ТБК-АП у КФ досліджуваного штаму при культивуванні на обох середовищах, яка полягає у віковому збігу максимумів активності процесів ПОЛ дослідженої культури *P. ostreatus*. Незважаючи на те, що використані живильні середовища не містять лігніну, у досліді доведена здатність штаму P-107 до ініціювання реакцій ПОЛ у зовнішньому середовищі.

Таким чином, при вирощуванні штаму P-107 на глюкозо-пептонному середовищі спостерігається більше, ніж на синтетичному середовищі, накопичення біомаси та значно нижчий рівень вмісту продуктів ПОЛ у міцелії і КФ. Максимальна активність процесів ПОЛ у міцелії на обох живильних середовищах зафіксована на 6-ту та 12-ту добу, а у культуральній рідині — на 6-ту добу росту. Протягом культивування на обох середовищах відбувається поступове збільшення кислотності середовища. Динаміка концентрації білка у КФ має індивідуальні особливості при ферментації на ГПС і СС через відмінності в їх початковому складі. Отже, склад живильного середовища впливає не лише на накопичення біомаси, а й на такий важливий інтегральний показник стану функціонування штаму P-107 *P. ostreatus*, як інтенсивність процесів ПОЛ, що може виконувати роль тригера в механізмах стресу та адаптації.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Гвоздиков Т.С. Новые биологически активные добавки на основе глубинного мицелия базидиальных грибов // Успехи медицинской микологии. — 2006. — Т. 7. — С. 178—180.
2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. — 1991. — Т. 111, Вып. 6. — С. 923—932.
3. Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П., Дудка И.А., Кулеш М.Д., Соломко Э.Ф., Шевченко С.В. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. — К.: Наук. думка, 1983. — 311 с.
4. Бисько Н.А., Митропольская Н.Ю., Соломко Э.Ф. Лекарственные грибы для здоровья и красоты. — К.: Наук. думка, 2003. — 40 с.
5. Бухало А.С., Бисько Н.А., Соломко Э.Ф., Билай В.Т., Митропольская Н.Ю., Поединок Н.Л., Гродзинская А.А., Михайлова О.Б. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации. — К.: Чернобыльинтеринфом, 2004. — 120 с.
6. Дарбре А. Практическая химия белка. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
7. Дослідження пероксидної окисації ліпідів та антиоксидантного захисту організму в клінічній практиці (методичні рекомендації) / Б.В. Качоровський, В.Л. Новак, В.П. Руденко, М.Ю. Аношина, О.В. Стасишин, А.Б. Новосад. — Львів, 2002. — 20 с.
8. Капич А.Н. Процессы перекисного окисления липидов у грибов (биотехнологические аспекты) // Проблемы микробиологии и биотехнологии — Минск, 1998. — С. 185—188.
9. Петров П.Т., Скрипко А.Д., Литвинова К.В., Дедюшко Н.А., Гриневич Л.Н. Новые лекарственные средства на основе биологически активных соединений мицелиальных грибов // Успехи медицинской микологии. — 2006. — Т. 7. — С. 198—199.
10. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
11. Соломко Э.Ф. Химический состав и пищевая ценность вешенки // Съедобный гриб вешенка: мицелий, субстрат, выращивание. — К., 2001. — С. 35.
12. Gunde-Cimerman N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* // International Journal of Medicinal Mushrooms. — 1999. — P. 69—80.
13. McCord J.M. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress // Am J Med. — 2000. — Vol. 108. — P. 652—659.
14. Thom S., Elbukem M. Oxygen-Dependent Antagonism of Lipid Peroxidation // Free Radical Biol Med. — 1991. — Vol. 10. — P. 413—426.





**А.В. Чайка, О.В. Федотов**

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

## **РОСТ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ШТАММА *PLEUROTUS OSTREATUS* P-107**

### **Реферат**

Исследована динамика накопления биомассы и содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), активных к тиобарбитуровой кислоте, в мицелии и культуральном фильтрате штамма вешенки *Pleurotus ostreatus* P-107, который культивировали на глюкозо-пептонной и стандартной синтетической питательных средах. Установлено, что большее накопление биомассы и меньшая концентрация продуктов ПОЛ присуща культуре, растущей на глюкозо-пептонной среде. На обеих средах обнаружены подобные закономерности динамики содержания продуктов ПОЛ.

Ключевые слова: базидиомицеты, перекисное окисление липидов, питательные среды.

**O.V. Chaika, O.V. Fedotov**

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

## **GROWTH AND INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES OF *PLEUROTUS OSTREATUS* P-107 STRAIN**

### **Summary**

The dynamics of biomass accumulation intensity and maintenance of lipid peroxidation products – the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), in the mycelium and culture filtrate (CF) of strain Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* P-107, cultivated on glucose-peptone (GPM) and standard synthetic (SM) nutrient media were studied. It was established that higher accumulation of biomass and lower concentration of LPO products are inherent for strain growing on glucose-peptone medium. The conformity of the dynamics of LPO products maintenance changes during cultivation on both media was revealed.

Key words: basidiomycetes, lipid peroxidation, nutrient media.

