

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

СКРИНІНГ ШТАМІВ БАЗИДІОМІЦЕТІВ ЗА АКТИВНІСТЮ АНТИОКСИДАНТНИХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

Досліджено динаміку росту та каталазної, пероксидазної і супероксиддисмутазної активності 14 штамів 10 видів базидіоміцетів при культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі. Відібрані штами – активні продуценти антиоксидантних ферментів, які після додаткових досліджень з оптимізації умов культивування можуть бути використані в біотехнології ферментних препаратів.

Ключові слова: базидіоміцети; антиоксидантні оксидоредуктази; каталазна, пероксидазна і супероксиддисмутазна активність.

Промислове виробництво більшості біологічно активних речовин, а саме антибіотиків, вітамінів, полісахаридів, ферментів тощо, здійснюється організмами-продуцентами мікробіологічного або мікологічного походження [3, 4]. Переваги грибів перед мікроорганізмами полягають у тому, що вони здатні рости на відносно дешевих живильних середовищах в умовах поверхневого і глибинного культивування, не дають спорношення на стадії вегетативного росту, що знижує небезпеку професійних захворювань людей у біотехнологічному виробництві; отримання екзометаболітів не вимагає значних витрат; грибні метаболіти за низкою властивостей (оптимум рН і температури дії) більш близькі до тваринних [3, 13, 18].

Встановлено, що ксилотрофні базидіоміцети мають добре розвинений ферментативний апарат. Ензими грибів досліджуються в таких напрямках: при вивченні молекулярних основ фізіології і процесів росту; у зв'язку з інтенсифікацією метаболічних процесів продуцентів для підвищення виходу продуктів у біотехнології; з метою отримання біоенергії або деяких хімічних речовин. Здатність до деструкції складних полімерів, в т.ч. поліютантів відкриває новий напрям їх використання у екобіотехнології [1, 14, 18]. Всі ці процеси супроводжуються утворенням активних форм кисню (АФК) – оксидативним стресом [8, 15, 16].

Оксидативний стрес – це реакція клітини на підвищення рівня активних форм кисню внаслідок порушення рівноваги між процесами їх



генерації та детоксикації. Протистоїть цим процесам антиоксидантна система, що представлена п'ятьма рівнями, два з яких — ферментативне знешкодження супероксидного аніон-радикалу і перекису водню та відновлення гідроперексидів поліненасичених жирних кислот [6, 15].

Ферменти антиоксидантного захисту (АОЗ) — це високомолекулярні сполуки, до яких належать пероксидази (КФ 1.11.1.7), каталаза (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) тощо. Ці ферменти знайшли широке застосування у медицині та різних галузях промисловості, зокрема: пероксидаза — як діагностичний реагент або маркерний фермент в імуноферментному аналізі, як консервант у харчовій промисловості; каталаза — як компонент сорбенту для стабілізації препаратів крові, для холодної стерилізації харчових продуктів, у процесах органічного синтезу і полімеризації каучуку; супероксиддисмутаза — як компонент лікарських протизапальних препаратів, а також у харчовій промисловості [2, 10, 12].

Традиційними джерелами промислового отримання пероксидаз є рослини *Armoracia rusticana* і *Nicotiana tabacum* та базидіоміцет *Coprinus cinereus*, каталази — тваринні тканини, мікроміцети родів *Penicillium* та *Aspergillus*, супероксиддисмутази — тваринні тканини та мікроорганізми — *Pseudomonas putida*, *Nocardopsis*, *Gluconobacter*, *Saccharomyces cerevisiae*, рекомбінантні штами *Escherichia coli* та *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. Промислові ферменти є коштовними та у ряді випадків токсичними, що обмежує їх використання і обумовлює актуальність пошуку нових організмів-продуцентів цих речовин, в т.ч. серед базидіоміцетів [2, 10, 12, 16].

Метою даної роботи був скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були 14 штамів, що належать до 10 видів класу *Basidiomycetes*. Загальні відомості щодо досліджених штамів базидіальних грибів представлено в таблиці 1, де зазначено: загальний список штамів, їх систематичне положення (розглядається згідно сучасних літературних джерел [17]); джерело надходження: місце збору дикорослих у природі плодових тіл (ДПТ), з яких інтродуковані відповідні культури; рік збору, отримання відповідного штаму.

Всі штами виділені в чисту культуру з дикорослих плодових тіл грибів, зібраних в різних місцевостях Донецької області (примітка). Інтродуковані штами зберігаються у Колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин ДонНУ та передані до Колекції культур шапінкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (ІВК). Штами підтримуються при 5 ± 1 °С на агаризованому незахміленому пивному суслі (4° за Баллінгом) і пересіваються з перевіркою чистоти кожні 5–6 місяців.



Таблиця 1

Штами базидіоміцетів, що використані в роботі

Table 1

Strains of basidiomycetes used in the study

Вид	Штам	Джерело надходження*	Рік отримання
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.: Fr.	Sc-10	Дн	2010
<i>Fistulina hepatica</i> Schff. ex Fr.	Fh-08	КЛ	2008
<i>Irpex lacteus</i> Fr.	П-4к	Дн	2008
<i>Fomes fomentarius</i> (L. ex Fr.) Gill.	T-10	Дн	2010
<i>Daedalea quercina</i> Fr.	Dq-08	КЛ	2008
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.: Fr.) Murrill	Ls-08	Дн	2008
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.: Fr.) P. Karst.	G1-2	Сн	2009
<i>Agrocybe aegerita</i> (Brig.) Singer	167	ІВК	2009
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-2	Дн	2009
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-104	НПП «СГ»	2004
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-vv	Дн	2002
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-088	ДБС	1998
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-089	ДБС	1998
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-105	СЛ	2004

Примітка: «*» — вказані скорочені назви місць збору ДПТ, з яких інтродуковані відповідні культури:

ДБС — Донецький ботанічний сад НАН України, Дн — м. Донецьк, ІВК — шифр Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, КЛ — Красноліманське лісництво, НПП «СГ» — національний природний парк «Святі гори», СЛ — Слов'янське лісництво, Сн — м. Сніжне.

Дослідні штами культивували поверхнево в колбах Ерленмейера ємністю 250 мл на глюкозо-пептонному живильному середовищі (ГПС, рН₀ = 6,32) об'ємом 50 мл такого складу, г/л: глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; КН₂РО₄ — 0,6; К₂НРО₄ — 0,4; MgSO₄ · 7H₂O — 0,5; СаСl₂ — 0,05; ZnSO₄ · 7H₂O — 0,001. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури штамів на сусли-агарі. Температура культивування 27,5 °С. Строк ферментації у 12 діб було обрано виходячи з результатів попередніх досліджень, у яких виявлені максимуми активності досліджуваних ферментів саме у період експоненціального росту, та пояснюється



недоцільністю довгострокового культивування продуцентів [4, 18, 20]. Визначення ферментативної активності у міцелії (на одиницю маси, г) та культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, мл) проводили на 6-у, 9-у та 12-у добу культивування. Матеріалами для досліджень були гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ). МГ та КФ готували таким чином. Міцелій при 5 ± 1 °С відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Біомасу міцелію визначали ваговим методом [7]. Отриманий міцелій додатково підсушували на фільтрувальному папері і охолоджували до $1\pm 0,5$ °С. Підготовлений міцелій гомогенізували шляхом розтирання у стерильній ступці. Досліджувану ферментативну активність оцінювали спектрофотометричними методами: пероксидазну (ПА) – за інтенсивністю забарвлення продукту окиснювання о-діанізидину перекисом водню [7]; каталазну – за забарвленням продукту реакції перекису водню з молібдатом амонію [20]; супероксиддисмутазну – за її здатністю пригнічувати реакцію аутоокиснення адреналіну в лужному середовищі [19].

Досліди проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані обробляли з використанням програм для проведення статистичного опрацювання результатів біологічних експериментів. З метою визначення впливу терміну культивування на активність досліджуваних ферментів був проведений однофакторний дисперсійний аналіз, порівняння дат здійснювалося за методом Дункана. Достовірною вважалася різниця за рівня вірогідності $P > 0,95$. З метою встановлення ступеня спряженості між ознаками, які варіюють, та для визначення спрямованості існуючого між ними зв'язку проводили кореляційний аналіз [11].

Результати та обговорення

Доцільність проведення скринінгових досліджень з біосинтетичних і ростових показників ксилотрофів на глюкозо-пептонному середовищі показана у ряді робіт [7, 5, 9, 18]. Отже, на першому етапі аналізу експериментальних даних оцінювали динаміку накопичення біомаси досліджуваними штамми базидіоміцетів при їх поверхневому рості на ГПС. Ці дані представлені у таблиці 2.

Її дані (табл. 2.) свідчать про те, що всі вивчені штами досягають максимального значення накопичення біомаси наприкінці терміну культивування – 12-у добу росту. Тобто спостерігається прямопропорційна залежність між терміном культивування та накопиченням біомаси міцелієм в інтервалі спостережень. Найвищі показники накопичення біомаси зафіксовано для шт. *S. commune* Sc-10, *P. ostreatus* P-088, *F. velutipes* F-vv, а найнижчі – для шт. *F. fomentarius* T-10, *L. sulphureus* Ls-08, *I. lacteus* II-4К.

Наступним етапом роботи було визначення активності оксидоредуктаз в мікологічному матеріалі.



Таблиця 2

Динаміка накопичення біомаси (г/л) штамами базидіоміцетів в залежності від часу культивування

Table 2

Dynamics of accumulation of biomass (g/l) by some basidiomycetes strains depending on time of cultivation

Штам	Біомаса		
	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	0,95 ± 0,05	2,85 ± 0,04	3,22 ± 0,09
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	1,20 ± 0,10	2,02 ± 0,23	2,56 ± 0,15
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	0,65 ± 0,03	1,32 ± 0,02	3,25 ± 0,11
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	0,21 ± 0,04	1,42 ± 0,20	2,67 ± 0,18
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	0,19 ± 0,07	1,83 ± 0,13	2,97 ± 0,17
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	0,67 ± 0,25	3,02 ± 0,02	3,31 ± 0,02
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	0,74 ± 0,01	0,85 ± 0,02	1,96 ± 0,02
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	0,74 ± 0,21	1,98 ± 0,18	2,69 ± 0,07
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	1,25 ± 0,11	2,08 ± 0,27	2,21 ± 0,12
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	0,23 ± 0,01	1,01 ± 0,07	2,02 ± 0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	0,48 ± 0,01	0,84 ± 0,06	3,41 ± 0,17
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	0,60 ± 0,04	0,93 ± 0,10	3,29 ± 0,13
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	0,64 ± 0,01	1,04 ± 0,02	3,21 ± 0,01
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	1,47 ± 0,21	2,25 ± 0,14	3,49 ± 0,08

Примітка: $p \leq 0,05$

Як показали результати дослідження, всі вивчені штами базидіоміцетів здатні до синтезу антиоксидантних ферментів — пероксидази, каталази і супероксиддисмутази.

Динаміка пероксидазної активності міцелію та культурального фільтрату вивчених штамів базидіоміцетів надана у таблиці 3.

За даними таблиці 3, максимальні значення ПА міцелію більшості штамів спостерігаються на 12-у добу культивування. Для штамів *F. velutipes* F-104 і *L. sulphureus* Ls-08, значення ПА на 9-ту добу вірогідно не відрізняється від цієї величини на 12-у добу росту. Винятком є штами *F. velutipes* F-2 та *F. hepatica* Fh-08, максимуми ПА міцелію яких відповідають 9-й добі культивування. Максимальний рівень ПА міцелію серед досліджених культур зафіксований у штамів *A. aegerita* 167, *F. hepatica* Fh-08 та *F. velutipes* F-vv, мінімальне — у штаму *L. sulphureus* Ls-08.



Таблиця 3

Динаміка пероксидазної активності (10^{-3} , у.о. *) штамів базидіоміцетів в залежності від часу культивування

Table 3

Dynamics of peroxidase activity (10^{-3} , a.e.) of some basidiomycetes strains depending on time of cultivation

Штам	Мицелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	2,37 ±0,12	4,81 ±0,10	9,44 ±0,12	1,88 ±0,14	4,65 ±0,21	7,82 ±0,46
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	0,10 ±0,03	0,70 ±0,09	0,89 ±0,09	0,06 ±0,01	0,47 ±0,10	0,47 ±0,10
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	1,13 ±0,10	1,26 ±0,11	1,09 ±0,08	1,09 ±0,07	0,94 ±0,12	0,94 ±0,05
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	0,08 ±0,02	0,63 ±0,07	0,63 ±0,01	0,07 ±0,01	0,63 ±0,02	0,63 ±0,03
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	0,15 ±0,01	0,94 ±0,12	0,47 ±0,07	0,07 ±0,01	0,43 ±0,08	1,56 ±0,21
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	0,10 ±0,02	0,63 ±0,08	2,35 ±0,31	0,07 ±0,03	0,31 ±0,09	0,94 ±0,14
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	0,63 ±0,10	0,31 ±0,06	0,75 ±0,12	0,11 ±0,09	0,63 ±0,06	0,59 ±0,09
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	0,08 ±0,01	0,63 ±0,12	0,93 ±0,32	0,06 ±0,01	0,63 ±0,09	0,73 ±0,12
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	0,07 ±0,02	0,25 ±0,07	0,48 ±0,11	0,06 ±0,02	0,07 ±0,02	0,22 ±0,09
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	0,06 ±0,02	0,47 ±0,12	0,43 ±0,21	0,05 ±0,02	0,07 ±0,01	0,09 ±0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	0,73 ±0,11	0,63 ±0,06	0,78 ±0,08	0,09 ±0,02	0,47 ±0,04	0,56 ±0,02
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	0,22 ±0,02	0,78 ±0,07	0,94 ±0,04	0,19 ±0,02	0,63 ±0,07	0,78 ±0,06
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	0,31 ±0,03	0,78 ±0,07	1,56 ±0,11	0,14 ±0,01	0,56 ±0,09	1,25 ±0,10
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	0,09 ±0,03	0,71 ±0,22	0,83 ±0,10	0,06 ±0,01	0,94 ±0,10	0,63 ±0,10

Примітка: «*» — у.о. пероксидазної активності відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 мкмоль H_2O_2 за одну хвилину в оптимальних умовах (20 °C) [7]; $p \leq 0,05$.



Максимум ПА КФ також для більшості штамів припадає на 12-у добу культивування. Як виняток, найвищу ПА КФ на 9-у добу мали штами *S. commune* Sc-10 і *F. fomentarius* T-10 та *D. quercina* Dq-08 (для якого відсутня вірогідна різниця величини ПА КФ на 6-ту та 9-ту добу росту), та на 6-ту добу культивування — штам *F. hepatica* Fh-08. Найбільші значення ПА КФ серед досліджених культур в порядку убутання зафіксовані у штамів *A. aegerita* 167, *F. velutipes* F-2, *P. ostreatus* P-105, *F. hepatica* Fh-08, найменше — у штаму *L. sulphureus* Ls-08 та *I. lacteus* Il-4К.

Максимальний рівень ПА серед досліджених штамів зафіксований у міцелію для шт. *A. aegerita* 167 на 12-у добу ферментації, який становить 9,44 у.о. З метою порівняння наведемо значення ПА коренів *Armoracia rusticana* — традиційного джерела отримання ферменту пероксидази, що складає 1,6 Е/мл, де Е — одиниця ферментативної активності, яка дорівнює кількості ферменту у мг, що каталізує перетворення 1 мкмоль H_2O_2 за 1 хвилину [12].

Для всіх штамів спостерігається позитивна кореляція між показником ПА міцелію та ПА КФ, за винятком шт. *F. hepatica* Fh-08 і шт. *F. fomentarius* T-10, для яких кореляція цих показників негативна. Переважна більшість досліджених штамів показали позитивну кореляцію між рівнем ПА (як міцелію так і КФ) та терміном культивування, винятком є шт. *F. hepatica* Fh-08 з негативною кореляцією цих показників.

Отже, результати вивчення пероксидазної активності культур базидіоміцетів дозволяють рекомендувати штами *A. aegerita* 167, *F. velutipes* F-2, *P. ostreatus* P-105 та *F. hepatica* Fh-08 для подальшого дослідження з метою можливого використання як продуцентів ферменту пероксидази.

Результати вивчення динаміки каталазної активності штамів базидіоміцетів наведені у таблиці 4.

Як бачимо, найвищі значення КА у міцелії більшості штамів спостерігаються на 12-ту добу культивування. Виключенням є штам *F. velutipes* F-104 та штам *G. lucidum* Gl-2, максимум КА яких припадає на 6-у добу росту. Показники КА міцелію штаму *S. commune* Sc-10 у 6-и і 9-и добовому віці вірогідно не відрізняються. Максимум КА міцелію штаму *F. fomentarius* T-10 зафіксовано на 9-у, а штаму *P. ostreatus* P-105 — на 9-у і 12-у добу ферментації. Серед досліджених штамів, максимальну каталазну активність міцелію зафіксовано для штамів *F. velutipes* F-2, *F. velutipes* F-vv, *F. fomentarius* T-10 та *F. hepatica* Fh-08 у порядку убутання цього показника, а мінімальну — для штаму *F. velutipes* F-104.

Для штамів *P. ostreatus* P-088, P-089 і P-105, *F. hepatica* Fh-08, *D. quercina* Dq-08 та *I. lacteus* Il-4К спостерігається позитивна кореляція між рівнем КА міцелію та КА КФ, для штаму *F. velutipes* F-104 кореляція цих показників відсутня, а для решти штамів — негативна.

Таблиця 4

Динаміка каталазної активності (мкат/г (мл)) штамів базидіоміцетів
в залежності від часу культивування

Table 4

Dynamics of catalase activity (mkat/g (ml)) of some basidiomycetes strains
depending on time of cultivation

Штам	Міцелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	86,6 ±0,2	82,2 ±0,2	119,9 ±1,4	86,6 ±0,6	66,6 ±1,8	93,2 ±0,8
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	79,9 ±2,0	73,2 ±1,2	193,8 ±3,1	119,9 ±2,1	53,3 ±0,7	113,9 ±1,5
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	173,2 ±3,8	106,6 ±3,9	340,3 ±3,2	53,3 ±1,2	99,9 ±1,9	100,6 ±0,5
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	66,6 ±1,0	33,3 ±0,8	33,3 ±0,6	33,3 ±0,4	153,2 ±2,1	153,2 ±2,7
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	173,2 ±4,1	79,9 ±1,3	765,4 ±2,6	71,0 ±2,1	73,3 ±0,4	59,9 ±1,4
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	279,7 ±3,6	132,2 ±2,4	466,2 ±3,0	186,2 ±2,3	66,6 ±0,8	59,9 ±1,9
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	233,1 ±3,4	452,9 ±5,8	93,2 ±0,3	86,6 ±1,0	59,9 ±0,4	59,9 ±0,2
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	173,2 ±4,0	59,9 ±1,1	19,9 ±0,7	39,9 ±0,2	66,6 ±0,9	113,2 ±1,8
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	13,3 ±0,2	39,9 ±1,0	246,4 ±4,5	93,2 ±0,8	106,6 ±1,7	100,6 ±1,0
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	93,2 ±0,7	72,2 ±0,7	133,2 ±1,3	46,6 ±0,4	46,6 0,4	39,9 ±0,8
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	86,6 ±0,30	106,6 ±0,6	153,9 ±1,1	79,9 ±0,6	100,6 ±1,9	106,6 ±0,5
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	112,2 ±1,4	146,5 ±2,6	273,7 ±2,9	73,3 ±0,8	93,2 ±1,8	113,9 ±4,6
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	109,6 ±1,9	140,5 ±2,2	146,5 ±0,8	99,9 ±0,7	106,6 ±2,4	140,5 ±0,9
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	99,9 ±1,2	119,9 ±2,2	79,9 ±0,9	73,3 ±1,0	73,3 ±1,0	79,9 ±0,9

Примітка: $p \leq 0,05$



Також зафіксована негативна кореляція між показником КА міцелію та терміном культивування штамів *F. velutipes* F-104, *G. lucidum* Gl-2, *S. commune* Sc-10 і *F. fomentarius* T-10, та позитивна — для всіх інших штамів. Для більшості штамів встановлена позитивна кореляція між показником КА КФ та терміном культивування, за винятком штамів *F. velutipes* F-2 і F-vv, *D. quercina* Dq-08, *L. sulphureus* Ls-08 та *F. fomentarius* T-10, для яких ця кореляція є негативною.

У 12-ти денному міцелії шт. *F. velutipes* F-2 зафіксовано максимальне серед досліджених штамів значення КА — 765,4 мкат/г. Зазначимо, що КА сироватки крові тварин — одного з джерел промислового отримання ферменту каталази складає від 16,8 до 166,6 мкат/л [20].

Дані щодо супероксиддисмутази активності досліджених штамів базидіоміцетів надані у таблиці 5.

Штами видів *G. lucidum*, *D. quercina*, *I. lacteus* та *F. fomentarius* мають максимум СА міцелію у віці 9-и діб, а видів *F. velutipes*, *P. ostreatus* і *F. hepatica* — 12-и діб. Максимальний рівень СА міцелію вірогідно не відрізняється у штамів видів *S. commune* і *L. sulphureus* на 9-у та 12-у добу культивування, а штаму *A. aegerita* 167 — на 6-у та 9-у добу. Найвищий рівень СА міцелію серед досліджених штамів зареєстрований у шт. *F. hepatica* Fh-08, та дещо нижчий — шт. *P. ostreatus* P-088 і P-105, шт. *I. lacteus* Il-4K та шт. *F. fomentarius* T-10.

Максимальні значення СА КФ шт. *F. hepatica* Fh-08 та дещо нижчі — шт. *P. ostreatus* P-088 і P-105 зафіксовані на 12-у добу культивування. Штам *F. fomentarius* T-10 має найнижчий рівень активності цього ферменту.

Для штамів *P. ostreatus* P-088, P-089 і P-105 виявлена висока кореляція між показником СА міцелію та СА КФ, а для шт. *F. velutipes* F-104 і F-vv, шт. *A. aegerita* 167 та шт. *F. fomentarius* T-10 спостерігається негативна кореляція. Для всіх штамів спостерігається позитивна кореляція між показником СА міцелію та терміном культивування, винятком є шт. *I. lacteus* Il-4K та шт. *A. aegerita* 167. Також, для більшості штамів, окрім шт. *I. lacteus* Il-4K та шт. *F. velutipes* F-vv, зафіксована позитивна кореляція між показником СА КФ та терміном культивування.

Максимальне значення СА серед досліджених штамів зафіксовано для шт. *F. hepatica* Fh-08 у КФ на 12-у добу ферментації та становить 113,0 у.о. З метою порівняння наведемо значення СА еритроцитів тварин — одного з джерел промислового отримання ферменту супероксиддисмутази, що складає 65 у.о. [19].

Таким чином, скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз дозволив виявити культури — активні продуценти цих ферментів. Так, найвища пероксидазна активність виявлена у шт. *A. aegerita* 167, шт. *F. velutipes* F-2, шт. *P. ostreatus* P-105 та шт. *F. hepatica* Fh-08; каталазна активність — у шт. *F. velutipes* F-vv; СА — у шт. *F. hepatica* Fh-08 та шт. *P. ostreatus* P-088 і P-105.

Таблиця 5

Динаміка супероксиддисмутазної активності (у.о. *) штамів базидіоміцетів залежно від часу культивування

Table 5

Dynamics of superoxide dismutase activity (a.e.) of some basidiomycetes strains depending on time of cultivation

Штам	Міцелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	21,7 ±0,7	22,1 ±0,6	12,5 ±0,4	18,2 ±0,1	20,6 ±0,2	33,3 ±0,1
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	21,9 ±1,5	37,8 ±0,5	24,3 ±1,0	18,2 ±0,3	37,8 ±0,7	20,0 ±0,8
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	54,5 ±1,2	52,5 ±1,2	88,9 ±1,9	47,9 ±1,0	64,2 ±0,8	113,0 ±0,2
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	21,1 ±0,5	15,4 ±0,7	26,8 ±0,8	18,2 ±0,2	30,8 ±1,4	28,1 ±0,8
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	32,5 ±1,1	18,5 ±0,5	40,0 ±1,0	26,1 ±0,6	9,0 ±0,9	29,1 ±0,2
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	36,1 ±0,9	39,0 ±1,2	42,3 ±1,3	70,0 ±2,4	29,0 ±0,9	21,4 ±0,7
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	20,1 ±0,8	58,3 ±1,7	37,5 ±1,0	12,5 ±0,1	12,5 ±0,2	16,7 ±0,2
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	26,7 ±0,5	36,1 ±0,8	26,8 ±0,4	22,6 ±0,4	38,5 ±0,2	23,1 ±0,3
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	48,2 ±1,1	55,6 ±1,4	34,9 ±0,8	45,5 ±0,9	60,0 ±0,4	34,0 ±1,1
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	24,1 ±1,3	33,3 ±0,3	33,3 ±1,1	14,9 ±0,4	26,6 ±0,5	41,7 ±0,8
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	27,1 ±0,6	27,1 ±0,8	79,5 ±2,6	21,0 ±0,7	21,0 ±0,9	54,7 ±1,4
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	16,6 ±0,3	16,6 ±0,3	36,2 ±0,8	8,8 ±0,1	8,8 ±0,2	20,0 ±0,6
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	23,1 ±0,5	23,1 ±0,6	74,0 ±2,3	18,2 ±0,4	18,2 ±0,4	49,0 ±1,0
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	21,4 ±0,9	26,4 ±0,6	24,6 ±0,4	20,1 ±0,6	28,7 ±0,6	25,0 ±0,4

Примітка: «*» – у.о. супероксиддисмутази відповідає пригніченню на 1% супероксиддисмутазою швидкості аутоокиснення адреналіну; $p \leq 0,05$.



Пероксидазна та каталазна активності міцелію досліджених штамів перевищують відповідні показники у КФ у 1,5–1,7 та у 2,0–2,2 рази. Супероксиддисмутазна активність, на відміну від ПА і КА, вища у культуральному фільтраті у 0,7–1,0 рази. Скоріш за все це пов'язано з тим, що більшість ферментів, до яких, ймовірно, належить супероксиддисмутаза, є екстрацелюлярними продуктами й виділяються у культуральне середовище, а у міцелії продуцента їх залишається близько 10–15%. На відміну від СОД, пероксидаза та каталаза, що зв'язані з клітинними органелами, надходять у культуральний фільтрат лише за умови руйнування клітин.

Отже, скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз показав суттєві коливання показників ферментативної активності досліджуваних штамів і видів базидіоміцетів, що дозволило відібрати перспективні штами — продуценти цих речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабицкая В.Г. Антиоксидантная активность грибов — деструкторов лигноцеллюлозных субстратов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 2. — С. 169–173.
2. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко // Цитология. — 2006. — Т. 48, № 6. — С. 465–474.
3. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов / Н.В. Белова // Микология и фитопатология. — 2004. — Т. 38, — Вып. 2. — С. 1–6.
4. Буценко Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів. Навч. посіб. / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
5. Бухало А.С. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / А.С. Бухало, Н.А. Бисько, Э.Ф. Соломко, В.Т. Билай, Н.Ю. Митропольская, Н.Л. Поединок, А.А. Гродзинская, О.Б. Михайлова. — К.: Чернобыльинтеринформ, 2004. — 128 с.
6. Гесслер Н.Н. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каратиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса / Н.Н. Гесслер, А.В. Соколов, В.Я. Быховский, Т.А. Белозерская // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 237–242.
7. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
8. Капич А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов / А.Н. Капич, Л.Н. Шишкина // Микология и фитопатология. — 1992. — Т. 26, № 6. — С. 486–492.



9. *Ломберг М.Л.* Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі: дис. канд. біол. наук: 03.00.21 / НАН України; Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного. — К., 2005. — 20 с.

10. *Мирошниченко О.С.* Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы / О.С. Мирошниченко // Биополимеры и клетка. — 1992. — Т. 8, № 6. — С. 3—25.

11. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.

12. *Рогожин В.В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. — СПб: ГИОРД, 2004. — 240 с.

13. *Соломко Э.Ф.* Перспективы использования лечебно-профилактических свойств культивируемых грибов в 21 веке / Э.Ф. Соломко, М.Л. Ломберг // Мат. наук.-практ. конф. «Нові технології при вирішенні медико-екологічних проблем». — К. — 2000. — С. 84—87.

14. *Терехова В.А.* Микотестирование химических воздействий / В.А.Терехова // Современная микология в России. — М. — 2008. — Т. 2. — С. 106.

15. *Byung Pal Yu.* Cellular defenses against damage from reactive oxygen species / Pal Yu. Byung // Physiological Reviews. — 1994. — Vol. 74. — P. 139—155.

16. *Jordan K. Zjawiony.* Biologically Active Compounds from *Aphyllophorales* (Polypore) Fungi // Journal of Natural Products. — 2004. — Vol. 67. — P. 300—310.

17. *Kirk P.M.* Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers — Wallingford, CAB International, 2001. — P. 655.

18. *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—126.

19. *Патент 2144674* Российской Федерации. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / Сирота Т.В. Заявка № 99103192/14, от 24.02.1999, кл. G01N33/52, G01N33/68, Бюл. № 1, от 20.01.2000.

20. *Патент 39243 А* України. Спосіб визначення каталазної активності базидіоміцетів / Федотов О.В., Гавриленко Г.В. Заявка № 2000116560, від 21.11.2000, кл. 7C12N9/58, Бюл. № 5, від 15.06.2001.



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

СКРИНІНГ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Реферат

Изучены динамика роста и каталазной, пероксидазной, супероксиддисмутазной активностей 14 штаммов 10 видов базидиомицетов при их культивировании на глюкозопептонной среде. Отобраны штаммы — активные продуценты антиоксидантных ферментов, которые после дополнительных исследований по оптимизации условий культивирования могут быть использованы в биотехнологии ферментных препаратов.

К л ю ч е в ы е с л о в а : базидиомицеты; антиоксидантные оксидоредуктазы; каталазная, пероксидазная, супероксиддисмутазная активность.

T.E. Voloshko, O.V. Fedotov

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

SCREENING OF ANTIOXIDANT OXIDOREDUCTASES OF STRAINS OF BASIDIOMYCETES

Summary

The dynamics of accumulation of biomass and dynamics of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase activity of 14 strains of basidiomycetes belonged to 10 species was investigated. Glucose-peptone medium was used to grow fungi. The dynamics of accumulation of biomass and dynamics of activity of antioxidant enzymes of some basidiomycetes strains was determined. The selected strains are the active producers of antioxidant enzymes. And they can be used in biotechnology to produce enzymes after further research.

Key words: basidiomycetes; antioxidant oxidoreductase; catalase, peroxidase and superoxide dismutase activity.

Одержано 21.09.2011.

