

© 2002 р. С.Г. Гумінецький, Б.М. Ніцович, М.І. Халайцян,  
І.Ю. Горшинська

Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича, Чернівці

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АМІНОКИСЛОТНИЙ І БІЛКОВИЙ ВМІСТ ПЛОДОВИХ ТІЛ ГРИБІВ ГЛИВИ

Встановлено, що присутність у поживному середовищі розчинів солей  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  і  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  різної концентрації в процесі вирощування грибів гливи за лабораторних умов істотно зменшує в їх плодових тілах вміст білків (альбумінів, глобулінів, проламінів і глутелінів) і, навпаки, збільшує концентрацію вільних амінокислот.

It has been seen that the presence of salts  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  of different concentrations in the nourishing media during the process of growing *Pleurotus ostreatus* mushrooms in laboratory environment, considerable decreases protein content (such as albumins, globulins, prolamines and glutelins) in the mushroom's fruiting body and, in contrast, increases concentration of free amino acids.

Одним із критеріїв поживної цінності їстівних грибів, до яких належить глива (*Pleurotus ostreatus*), є вміст у них вільних амінокислот і білків. Тому питанням кількісної оцінки зазначеного вмісту і особливостей їх культивування приділяється значна увага у відповідній науковій літературі, наприклад, у [1-3]. В [1] показано, що кращим поживним середовищем для вирощування дереворуйнівних грибів є відходи переробки олійних культур, зокрема соняшнику і сої. У роботі [3] наведені результати спектрофотометричних досліджень спектрів плодових тіл *Pleurotus ostreatus* у спектральному інтервалі 215-340 нм, що виростили в природних умовах у різних районах Чернівецької області. Показано, що вони суттєво відрізняються між собою як по вмісту вільних амінокислот, так і основних груп білків: альбумінів, глобулінів, проламінів і глутелінів.

У даній роботі розглядаються можливості використання спектрофотометричного методу дослідження екстрактів плодових тіл грибів гливи (штам *Fr. Kummer VKMF-453*) з метою виявлення впливу на їх спектри поглинання розчинів солей металів  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  і  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ . При цьому використовувалися штами грибів, вирощених у лабораторії при додаванні у поживне середовище розчинів солей вказаних металів різної концентрації, а також без солей. Останні слугували кон-

трольними зразками. Екстракти вільних амінокислот і основних груп білків для досліджень готувалися на кафедрі біохімії та експериментальної екології Чернівецького національного університету згідно з методикою, описаною в [4]. Оскільки отримані розчини, як правило, світлорозсіюючі (колоїдні), то для вимірювання спектрів їх поглинання використовувалася методика сферичного фотометра [5,6], яка дає можливість врахувати розсіяння.

Із літературних джерел відомо [7], що електронні спектри поглинання білків і вільних амінокислот знаходяться в області довжин хвиль  $\lambda < 320$  нм, тому вимірювання проводилися саме в цій області, тобто у спектральному інтервалі  $\lambda = 215-340$  нм. Відомо [7], що основний максимум поглинання більшості вільних амінокислот припадає на  $\lambda = 180-200$  нм, проте, через обмеження чутливості сферичного фотометра, можливим було реалізувати вимірювання, починаючи з  $\lambda = 215$  нм, для якої поглинання ще суттєве. Для підвищення точності вимірювань оптичної густини  $D$  екстракти вільних амінокислот розводилися у дистильованій воді у співвідношенні 1:7. При цьому знаходилися середні значення  $\langle D \rangle$  по декількох повторях (не менше трьох). Досліджувався вплив солей вказаних металів із концентраціями у поживному середовищі для кожної солі  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$  і  $10^{-4}$  М.

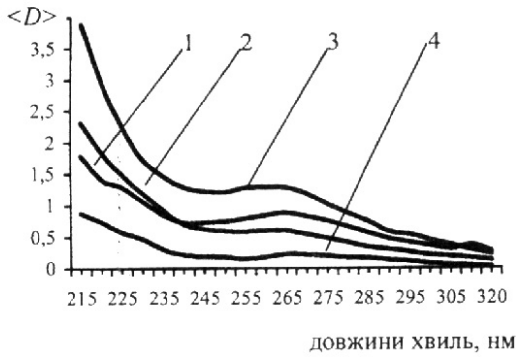


Рис.1. Спектри поглинання амінокислот для солей із концентрацією  $10^{-5}$  М:  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  (1),  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (2),  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  (3), контроль (4).

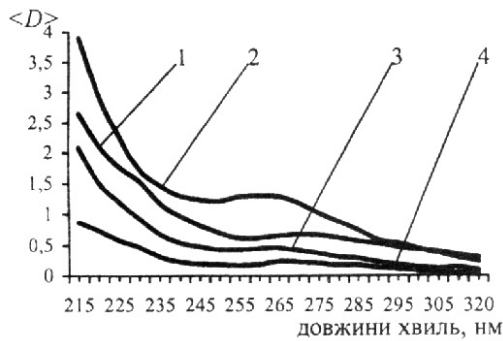


Рис.2. Спектри поглинання амінокислот при наявності солі алюмінію різної концентрації:  $10^{-4}$  М (1),  $10^{-5}$  М (2),  $10^{-8}$  М (3), контроль (4).

Аналіз отриманих спектрів поглинання екстрактів вільних амінокислот свідчить про те, що найбільший вплив порівняно з контрольними зразками на їх вміст у плодкових тілах гливи виявляє сіль алюмінію, а для всіх солей металів – концентрація  $10^{-5}$  М. Тому на рис.1 і рис.2 проілюстровані саме ці результати. Виходячи з прямо пропорційної залежності між оптичною густиною розчину і концентрацією в ньому поглинаючих молекул, із зображених на рис.1,2 графіків можна зробити такі висновки:

- у всіх випадках вміст вільних амінокислот у плодкових тілах *Pleurotus ostreatus*, вирощених з використанням у поживному середовищі солей металів, істотно вищий порівняно з контрольними зразками (криві 4);
- найбільша різниця у спектрах поглинання спостерігається в області  $\lambda < 235$  нм, для яких значення  $D$  визначає сумарний вміст амінокислот. Наявність ароматичних амінокислот визначається значеннями  $D$  при  $\lambda = 265$  нм (для фенілаланіну) і  $\lambda = 275$ -280 нм (для триптофану і тирозину). З літературних джерел відомо [3],

що сумарні значення величини екстинкції в області  $\lambda > 235$  нм для всіх інших амінокислот на 2-3 порядки менші, тому їх поглинанням тут можна знехтувати.

Виходячи зі спектральних залежностей величини екстинкції для кожної з ароматичних амінокислот, наведених у [3], і враховуючи зміщення їх максимумів у довгохвильову область на 10-15 нм у реальних біологічних середовищах, для кількісного абсорбційного спектрального аналізу тирозину і триптофану можна вибрати аналітичні довжини хвиль відповідно  $\lambda_1 = 240$  нм і  $\lambda_2 = 280$  нм, а для фенілаланіну –  $\lambda_3 = 265$  нм. Запишемо для цих довжин хвиль значення оптичних густин

$$D_{\lambda_1} = \epsilon_{\lambda_1 tr} c_{tr} l + \epsilon_{\lambda_1 f} c_f l,$$

$$D_{\lambda_2} = \epsilon_{\lambda_2 tr} c_{tr} l + \epsilon_{\lambda_2 f} c_f l, \quad (1)$$

$$D_{\lambda_3} = \epsilon_{\lambda_3 tr} c_{tr} l + \epsilon_{\lambda_3 f} c_f l.$$

Тут  $\epsilon_{\lambda_1 tr}$ ,  $\epsilon_{\lambda_2 tr}$ ,  $\epsilon_{\lambda_3 tr}$ ,  $c_{tr}$  – значення екстинкції тирозину для аналітичних довжин хвиль і його концентрація у розчині,  $\epsilon_{\lambda_1 f}$ ,  $\epsilon_{\lambda_2 f}$ ,  $\epsilon_{\lambda_3 f}$ ,  $c_f$  – відповідно для триптофану,  $\epsilon_{\lambda_3 f}$ ,  $c_f$  – для фенілаланіну,  $l$  – товщина кювети, дорівнює 1 см. Згідно з даними роботи [3], значення  $\epsilon_{\lambda_1 f}$  і  $\epsilon_{\lambda_2 f}$  для фенілаланіну дуже малі і ними можна знехтувати. З формул (1) знаходимо спочатку концентрації тирозину і триптофану, використовуючи перші два рівняння, а потім з третього – концентрацію фенілаланіну. Одержуємо:

$$c_f = \frac{D_{\lambda_1}}{\epsilon_{\lambda_1 f} l} - \frac{\epsilon_{\lambda_1 tr} \epsilon_{\lambda_1 tr} D_{\lambda_2} - \epsilon_{\lambda_2 tr} \epsilon_{\lambda_1 tr} D_{\lambda_1}}{\epsilon_{\lambda_1 f}^2 \epsilon_{\lambda_2 tr} l - \epsilon_{\lambda_1 tr} \epsilon_{\lambda_1 f} \epsilon_{\lambda_2 tr} l}, \quad (2)$$

$$c_{tr} = \frac{\epsilon_{\lambda_1 f} D_{\lambda_2} - \epsilon_{\lambda_2 f} D_{\lambda_1}}{\epsilon_{\lambda_1 f} \epsilon_{\lambda_2 tr} l - \epsilon_{\lambda_2 f} \epsilon_{\lambda_1 tr} l}, \quad (3)$$

$$c_f = \frac{D_{\lambda_3} - \epsilon_{\lambda_3 tr} l - \epsilon_{\lambda_3 f} l}{\epsilon_{\lambda_3 f} l}. \quad (4)$$

Результати відповідних розрахунків наведені у таблиці 1. Видно, що з ароматичних амінокислот в усіх випадках у плодкових тілах грибів гливи найбільшим є вміст фенілаланіну і найменшим – тирозину.

Сумарний вміст ароматичних амінокислот при наявності у поживному середовищі будь-якого з використаних металів вищий, ніж для контрольних зразків. Найбільша залежність від концентрації спостерігається для солей  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ , причому максимальний вміст амінокислот відповідає концентрації  $10^{-5}$  М для солей алюмінію і кадмію, і  $10^{-4}$  – для солі свинцю.

Експериментальні вимірювання вмісту білків проводилися аналогічно. Досліджувалися чотири групи білків: альбуміни, глобуліни, проламіни і глютеліни. Екстракти альбумінів, глобулінів і глютелінів являли собою водні розчини, а проламінів – на основі етилового спирту. З метою підвищення точності вимірювань при необхідності здійснювалося їх розбавлення у дистильованій воді у стільки разів, щоб оптична густина розчину у максимумі поглинання не перевищувала в процесі вимірювань одиниці. Для порівняльного якісного аналізу вмісту у плодових тілах гливи вказаних груп білків і в залежності від наявності у поживному середовищі солі того чи іншого металу різної концентрації проводився перерахунок вимірних значень оптичних густин з урахуванням кратності розбавлення. Крім того, оскільки в процесі виготовлення зразків кінцевий об'єм екстракту отримувався різним, хоча вага сухого порошку *Pleurotus ostreatus* в кожному випадку була однаковою і дорівнювала 0,25 г, проводився також перерахунок значень  $D$  з метою їх зведення до однакового об'єму екстракту  $V=100$  мл для всіх проб.

Деякі результати проведених досліджень у вигляді графіків зображені на рис.3,4. Тут  $\langle D \rangle$ , як і раніше, – середні значення оптичної густини по декількох повтореннях (не менше трьох). Рис.3 на прикладі альбумінів ілюструє вплив на спектри поглинання екстрактів наявності у поживному середовищі солей різних металів однієї концентрації ( $10^{-4}$  М). Видно, що у всьому спектральному інтервалі значення  $\langle D \rangle$  при наявності солей металів нижчі, ніж у контрольних зразків (без металів), за винятком солі алюмінію для  $\lambda > 235$  нм. Особливо велика різниця у спектрах спостерігається при використанні солі свинцю. Все це свідчить про те, що наявність у поживному середовищі солей вказаних металів суттєво знижує

вміст альбумінів у плодових тілах грибів гливи. Аналогічні результати отримані для інших груп білків, що, зокрема, підтверджується і графіками (рис.4), з яких випливає, що при дії солі свинцю концентрацією  $10^{-4}$  М у плодових тілах грибів гливи найменшим є вміст проламінів, а найбільшим – альбумінів. Найбільша різниця у значеннях  $\langle D \rangle$  у досліджуваному спектральному інтервалі спостерігається для  $\lambda=215$  нм, тому для порівняльного аналізу вмісту кожної з груп білків виберемо значення  $\langle D \rangle$  саме для цієї довжини хвилі. Вони наведені у таблиці 2.

Із поданих у таблиці 2 цифрових даних випливає:

- при введенні у поживне середовище солей вибраних металів незалежно від їх концентрації вміст білків у тілах гливи порівняно з контрольними зразками суттєво зменшується, особливо глютелінів;
- з ростом концентрації солей вміст проламінів і глютелінів спадає, а альбумінів і глобулінів – навпаки, в основному, зростає, наближаючись до контрольних значень;
- найбільш істотно зменшує концентрацію альбумінів, проламінів і глобулінів сіль свинцю, а глютелінів – сіль алюмінію.

Отже, приведені в роботі результати засвідчують, що наявність у поживному середовищі при вирощуванні грибів гливи азотнокислих солей свинцю, кадмію і алюмінію в усіх випадках спричиняє значне зменшення в них усіх груп білків і, навпаки, значне збільшення вмісту вільних амінокислот. Із фізіологічної точки зору це можна пояснити тим, що в присутності солей вказаних металів гальмується природний процес синтезу білків з амінокислот у плодових тілах грибів гливи, що приводить до їх нагромадження порівняно з контрольними зразками.

Таблиця 1. Концентрації ароматичних амінокислот мг% у плодових тілах *Pleurotus ostreatus*.

Амінокислоти	Контроль	Кадмій, М			Свинець, М			Алюміній, М		
		$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-8}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-8}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-8}$
триптофан	0,75	1,67	3,0	1,97	2,19	1,45	2,29	2,36	3,45	1,08
тирозин	0	0,973	0	0	0,46	1,11	0	0,97	0,87	0,87
фенілаланін	1,87	5,73	7,13	5,43	8,28	5,25	5,85	4,64	11,2	3,98
сум. вміст	2,62	8,36	10,13	7,40	10,93	7,81	8,14	7,97	15,49	5,93

Таблиця 2. Оптичні густини  $\langle D \rangle$  екстрактів білків для  $\lambda=215$  нм.

Група білків	Контроль	Алюміній, М			Свинець, М			Кадмій, М		
		$10^{-8}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-8}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-8}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
альбуміни	6,68	1,54	3,36	4,21	1,46	2,73	2,10	1,73	3,73	4,28
глобуліни	1,11	0,28	0,49	0,40	0,32	0,41	0,26	0,46	0,71	0,51
проламіни	1,19	0,53	0,25	0,28	0,58	0,23	0,17	0,59	0,23	0,25
глютеліни	5,10	0,54	0,36	0,52	0,72	0,49	0,46	1,02	0,42	0,30

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

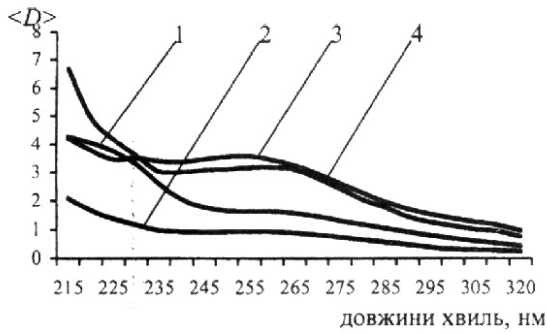


Рис.3. Спектри поглинання альбумінів для солей із концентрацією  $10^{-4}$  М:  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  (1),  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (2),  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  (3), контроль (4).

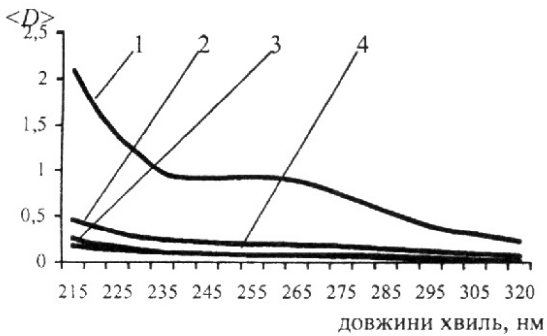


Рис.4. Спектри поглинання білків в присутності солі свинцю з концентрацією  $10^{-4}$  М: альбуміни (1), глобуліни (2), проламіни (3), гліотеліни (4).

1. Копильчук Г.П. Біологічна цінність білків вищих базидіоміцетів, культивованих на відходах переробки олійних культур // Науковий вісник ЧДУ. Біологія. - Чернівці: ЧДУ, 2000. - С.29-37.
2. Олешко В.С., Бабицкая В.Г. Аминокислотный и фракционный состав белков грибоного происхождения // Микология и фитопатология. - 1991. - **25**, вып.3. - С.233-239.
3. Kostyshyn S.S., Gorshynska I.J., Guminetsky S.G. Absorbion spectral analysis of proteins and free amino acids in *Pleurotus ostreatus* fruiting body extracts // SPIE. - 2001. - **4607**. - P.475-484.
4. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. - М.: Колос, 1985.
5. Рвачёв В.П., Гумінецький С.Г., Сахновский М.Ю. Дослідження поглинання вірусних суспензій на інтегральному фотометрі // Журнал прикладной спектроскопии. - 1968. - **8**, вып.5. - С.844-850.
6. Гумінецький С.Г. О методе измерений коэффициента отражения объектов на устройстве в виде спаренных фотометрических шаров // Оптика и спектроскопия. - 1995. - **78**, вып.3. - С.496-501.
7. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. - Киев: Наук. думка, 1981.