

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ — ПРОДУЦЕНТІВ КАТАЛАЗИ

Т. Є. Волошко
О. В. Федотов

Донецький національний університет, Україна

E-mail: bio.graff@yandex.ua

Отримано 05.04.2012

Досліджували динаміку росту та каталазну активність штамів базидіоміцетів за їх поверхневого культивування на глюкозопептонному середовищі. Об'єктами вивчення були 57 штамів, 5 із яких належать до 5 видів порядку *Polyporales*, а 52 — до 7 видів порядку *Agaricales*. З метою вивчення динаміки росту використовували ваговий метод визначення накопичення абсолютно сухої біомаси. Каталазну активність і вміст протеїну в міцелії та культуральному фільтраті визначали спектрофотометрично і на основі отриманих даних розраховували питому каталазну активність. Встановлено рівень накопичення біомаси та каталазної активності досліджених штамів на 9-й і 12-ту добу культивування, а також здатність більшості грибів до синтезу переважно позаклітинної каталази. Результати дослідження дали змогу відібрати штами — активні продуценти каталази, зокрема *F. velutipes* F-2 та *P. ostreatus* P-208, які є перспективними для використання в біотехнології одержання препаратів ензимів.

Ключові слова: базидіоміцети, каталазна активність.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) є компонентом комплексного ензиматичного захисту організму за умов оксидативного стресу. Головна її функція — розщеплення пероксиду водню на воду та молекулярний кисень, а також участь у ряді окиснювально-відновлювальних реакцій за участю різноманітних субстратів [1].

Завдяки високій каталітичній активності ензиму та його мультифункціональності, каталаза набула широкого застосування в різних галузях промисловості, сільськогосподарства та в медицині. Зокрема, її використовують у процесах деградації залишкових кількостей пероксиду водню в технологіях легкої, хімічної та харчової промисловості, як компонент біосенсорів для кількісного визначення вмісту пероксиду водню та етанолу [2–4]. Каталазу застосовують для створення антиоксидантних препаратів ензимів, а також у клінічній діагностиці в складі диференційно-діагностичних живильних середовищ для виявлення та обліку патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [5].

Уперше виділено й досліджено властивості промислового препарату каталази з клітин печінки тварин, який, однак, є високоартісним. Розроблено методи виді-

лення каталази з мікроміцетів родів *Penicillium* та *Aspergillus*. Проте відомо, що цвілеві гриби синтезують вторинні метаболіти — мікотоксини, які є токсичними для інших живих організмів. А оскільки каталаза є широко використовуваним ензимом, це зумовило активний пошук його продуцентів серед різних груп організмів [6–10].

Останнім часом у біотехнології сформувався новий напрям — фармацевтична мікологія — наука, що вивчає шляхи практичного використання грибів, у т. ч. й базидіальних [1, 6, 11]. Переваги цих грибів перед мікроорганізмами полягають у тому, що вони здатні до росту і синтезу багатьох класів біологічно активних речовин (БАР) на відносно дешевих живильних середовищах в умовах поверхневого і глибинного культивування. При цьому вони не дають спорношення на стадії вегетативного росту, що знижує небезпеку професійних захворювань у біотехнологічному виробництві. Одержання грибних екзометаболітів не потребує значних витрат, а за деякими властивостями (оптимум рН і температури) вони є більш близькими до тваринних [1].

Важливе місце серед БАР базидіальних грибів посідають антиоксидантні оксидоредуктази. Можливість синтезу позаклітинних

ензимів базидіоміцетами дає змогу використовувати їх для отримання цільових недорогих метаболітів. Окрім того, ці гриби можна культивувати на легкодоступних та відносно дешевих живильних середовищах і промислових відходах рециклічних технологій. Однією з важливих особливостей цих продуцентів є відсутність спороношення на стадії вегетативного міцелію, що забезпечує безпеку їх культивування [12].

Метою роботи було встановлення та порівняння динаміки росту і каталазної активності базидіальних грибів та відбір активних штамів — продуцентів цього ензиму.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були 57 штамів із колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету, що належать до 12 видів відділу *Basidiomycota*, порядку *Polyporales*: штами *Daedalea quercina* Fr. Dq-08, *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill. T-10, *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Gl-2, *Irpex lacteus* Fr. Il-4k, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Ls-08; порядку *Agaricales*: штами *Agrocybe aegerita* Fayod. 167, 218, 960, *Fistulina hepatica* Schff. ex Fr. Fh-08, *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. F-03, F-06, F-073, F-1, F-10, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-vv, F-610, *Pleurotus citrinopileatus* Singer. P-citr., *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quéf. P-er, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-105, P-107, P-12k, P-191, P-192, P-203, P-206, P-208, P-209, P-210, P-6v, P-кл, P-14, P-4к, P-91, P-94, P-998, P-447, P-2175, *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. Sc-10. Переважну більшість інтродукованих штамів (88%) виділено в чисту культуру з дикоростучих плодівих тіл базидіоміцетів, зібраних в різних місцевостях Донецької області, систематичне положення встановлено згідно з даними літератури [13].

З метою вивчення каталазної активності (КА) дослідні штами культивували поверхнево в колбах Ерленмеєра на глюкозопептонному живильному середовищі (ГПС, рН $6,5 \pm 0,2$) об'ємом 50 мл такого складу (г/л): глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; KH_2PO_4 — 0,6; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001. Інокулюмом слугували 10-денні міцеліальні культури штамів на сусло-агарі. Температура культивування становила $27,5^\circ\text{C}$. Строк ферментації —

12 діб, це зумовлено недоцільністю довгострокового культивування продуцентів та максимумом каталазної активності саме в період експоненціального росту, що доведено в попередніх дослідженнях [12]. Матеріалами для дослідів були гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ), які одержували таким чином. Міцелій при $5 \pm 1^\circ\text{C}$ відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування, додатково підсушували на фільтрувальному папері й охолоджували до $+1 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Підготовлений міцелій гомогенізували, розтираючи його в охолодженій ступці.

КА визначали в міцелії (на одиницю маси, г) та культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, мл) на 9-ту й 12-ту добу культивування спектрофотометрично, ґрунтуючись на здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 (Росія) за довжини хвилі 410 нм проти нульової проби з дистильованою водою. За одиницю активності каталази приймали таку кількість ензиму, яка бере участь у перетворенні 1 мкат пероксиду водню за 1 с при заданих умовах. Каталазну активність розраховували за формулою [14]:

$$\text{КА} = (\text{A}_\text{к} - \text{A}_\text{д}) \cdot \text{V} \cdot \text{t} \cdot \text{k} \cdot \text{p} \quad (\text{мкат} / \text{л}),$$

де КА — каталазна активність (мкат/л); $\text{A}_\text{к}$ та $\text{A}_\text{д}$ — екстинкція контрольної та дослідної проб; V — об'єм внесеної проби (0,1 мл); t — час інкубації (600 с); k — коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню, що дорівнює $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; p — коефіцієнт розведення.

Вміст водорозчинного протеїну в МГ та КФ визначали методом Лоурі-Хартрі [15].

Абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію встановлювали ваговим методом [16].

Питому каталазну активність (КА_{ПТ}) розраховували за формулою:

$$\text{КА}_{\text{ПТ}} = \text{КА} / \text{С}_\text{Б},$$

де $\text{С}_\text{Б}$ — концентрація протеїну в 1 мл КФ або гомогенату міцелію (мг/мл).

Дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали з використанням програм для статистичної обробки результатів біологічних експериментів. З метою визначення впливу терміну культивування на активність досліджуваних ензимів було проведено однофакторний дисперсійний аналіз. Достовірною вважали різницю за рівня вірогідності $P > 0,95$. Експериментальні дані обробляли

статистично, розраховуючи середнє значення з поправкою на стандартну похибку та порівнювали їх за критерієм Дункана (дані не порівнюють з контролем). Рисунки виконано у вигляді гістограми із зазначенням вірогідного інтервалу [16, 17].

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень визначали накопичення біомаси штамами базидіоміцетів на 9-ту й 12-ту добу культивування на ГПС (рис. 1).

У всіх досліджених штамах максимуму накопичення абсолютно сухої біомаси було досягнуто на 12-ту добу культивування. Найбільш продуктивними щодо цього показника є штами *F. velutipes* F-610 та *P. ostreatus* D-140 і P-203. Найнижчі значення біомаси зафіксовано для штамів *P. ostreatus* P-14 і P-192 та *P. citrinopileatus* P-citr. Отже, досліджені штами мають індивідуальні значення росту — накопичення біомаси в застосованих умовах культивування. Було виявлено значні коливання цього показника і в межах одного виду, що пояснюється індивідуальною мінливістю штамів. Так, швидкість накопичення АСБ для штамів *P. ostreatus* різнилась у 27,6 раза на 9-ту добу культивування і в 14,3 раза — на 12-ту, а для штамів *F. velutipes* — у 13,4 раза на 9-ту і 7,2 раза — на 12-ту добу ферментації.

КА і вміст протеїну в мікологічному матеріалі, а також питома КА міцелію та культурального фільтрату штамів базидіоміцетів наведено на рис. 2 та рис. 3 відповідно.

Для більшості штамів є характерною позитивна кореляція вивчених показників: найвищий рівень КА_{ПТ} як у міцелії, так і в КФ відповідає 12-й добі культивування. КА_{ПТ} міцелію деяких штамів, зокрема *Fomes fomentarius* T-10, *Pleurotus ostreatus* P-004, P-01, P-035, P-082, P-107, P-447 та *Schizophyllum commune* Sc-10, а також КА_{ПТ} КФ штамів *Pleurotus ostreatus* Hk-35, P-004, P-035, P-082 та інших, навпаки, знижується наприкінці терміну росту. Це, найімовірніше, пояснюється субстратною регуляцією активності ензиму й індивідуальними характеристиками цих штамів.

За даними дослідження, переважна більшість штамів базидіоміцетів (93%) синтезують позаклітинну каталазу, що підтверджується вищим рівнем її активності в КФ порівняно з міцелієм. Очевидно, це можна пояснити тим, що в природі синтез екстрацелюлярної каталази дереворуйнівними базидіоміцетами зумовлений генетично та індукуюється субстратом. У наших дослідках більшість міцеліальних культур також продукують ензими в живильне середовище, де відбувається розщеплення його компонентів. Так, у культуральному фільтраті абсолютний максимум питомої каталазної

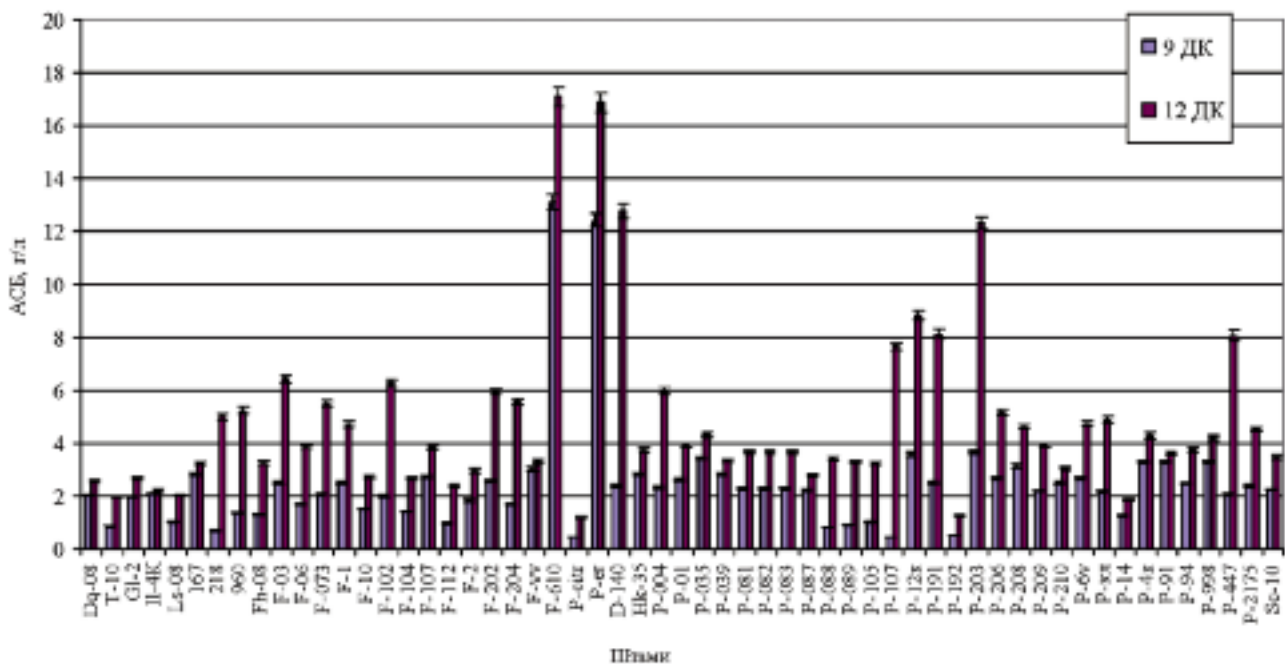


Рис. 1. Накопичення біомаси штамами базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) і 12-ту (12 ДК) добу культивування

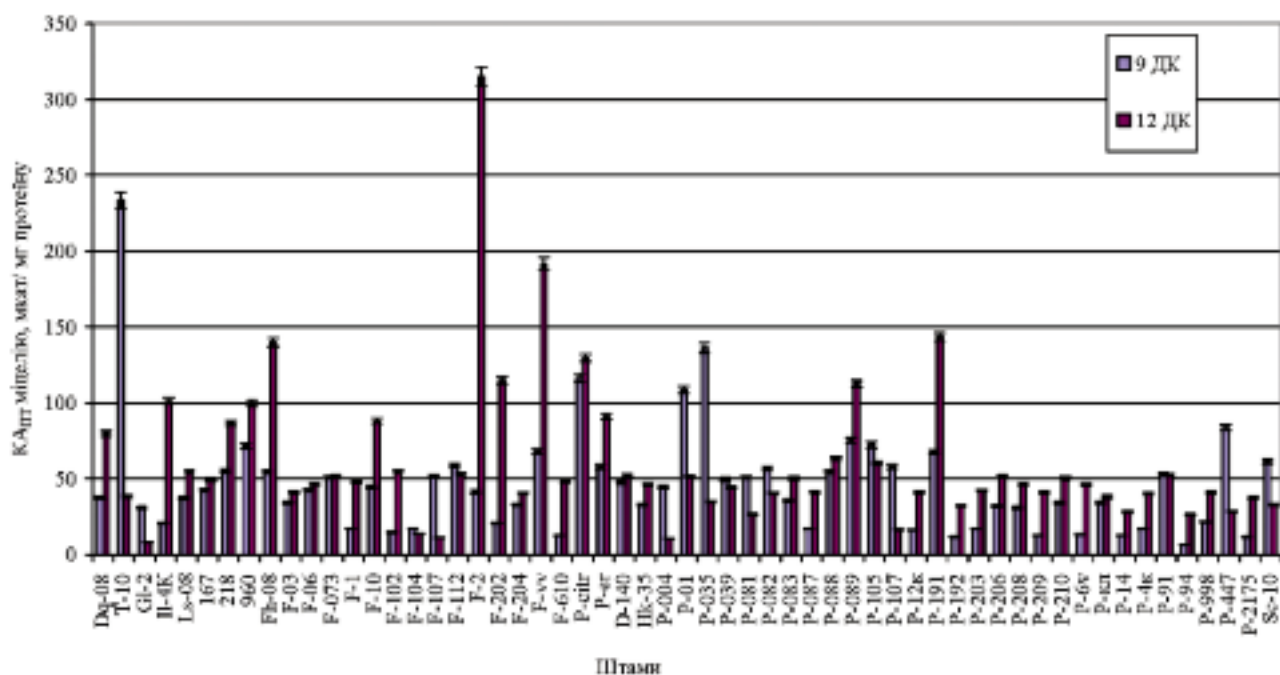


Рис. 2. Питома каталазна активність міцелію штамів базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) і 12-ту (12 ДК) добу культивування

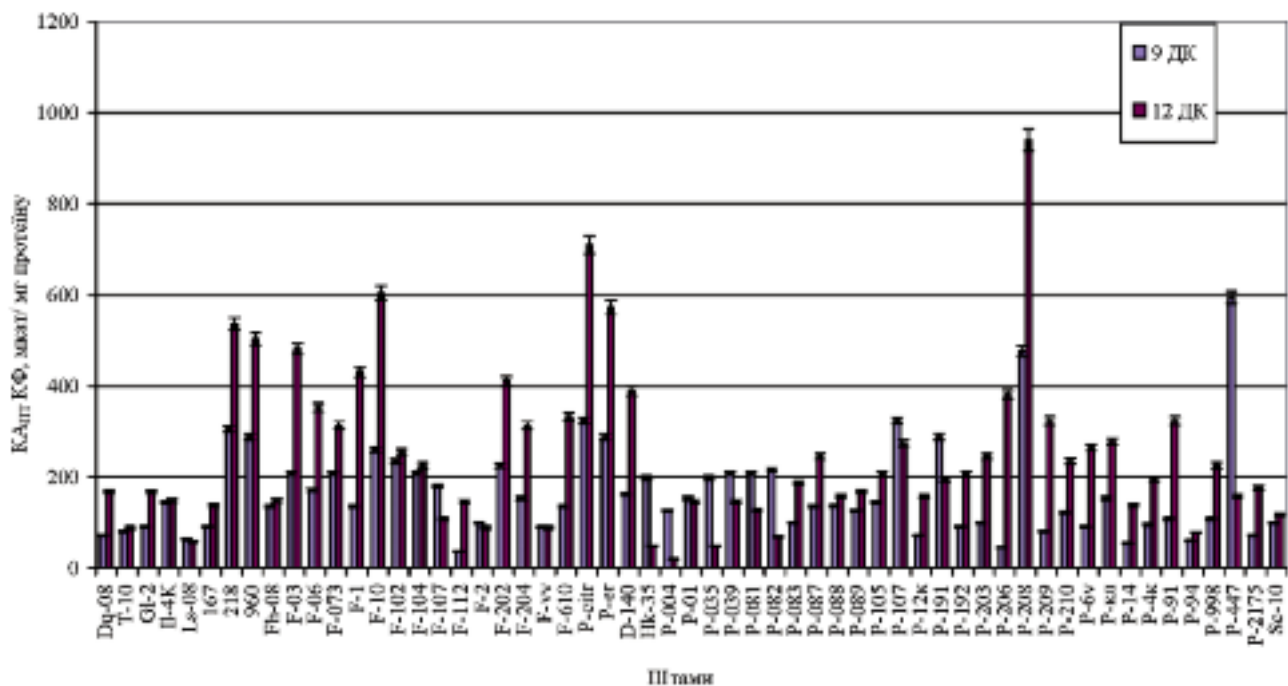


Рис. 3. Питома каталазна активність культурального фільтрату штамів базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) і 12-ту (12 ДК) добу культивування

активності серед досліджених базидіоміцетів зафіксовано для штаму *P. ostreatus* P-208 на 12-ту добу росту — 940,0 мкат/мг, що відповідає загальній КА КФ 639,2 мкат/мл.

Лише для 4 штамів — *Fomes fomentarius* T-10, *F. velutipes* F-112, F-2 та F-vv — виявлено вищий рівень КА_{ПТ} в міцелії, зокрема, абсолютний максимум активності міцелію штаму *F. velutipes* F-2, зафіксований на 12-ту добу росту, становить 314,9 мкат/мг і відповідає загальній КА 765,4 мкат/г. Така специфіка активності цих штамів, імовірно, пояснюється зосередженням катаболічних процесів у клітинах міцелію.

Для порівняння отриманих даних зазначимо, що загальна КА сироватки крові тварин — одного з джерел промислового отри-

мання ензиму каталази — становить від 16,8 до 166,6 мкат/л.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу встановити динаміку росту і каталазної активності 57 штамів 12 видів базидіальних грибів. На основі одержаних результатів відібрано культури *F. velutipes* F-2 та *P. ostreatus* P-208, що здатні до підвищеного синтезу цього ензиму і накопичення його в міцелії та культуральній рідині відповідно. Після оптимізації умов культивування низку біосинтетично активних штамів, зокрема штам *P. ostreatus* P-208, можна використовувати у біотехнології як продуцент екстрацелюлярної каталази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мирошниченко О. С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы // Биополимеры и клетка. — 1992. — Т. 8, № 6. — С. 3–25.
2. Стручкова И. В., Лазарева Е. С., Смирнов В. Ф. Амилазная и оксидоредуктазная активность микодеструктора *Aspergillus terreus* при его росте на новых полимерных материалах // Вест. Нижегородск. ун-та им. Н. И. Лобачевского. — 2010. — № 2 (2). — С. 591–595.
3. Amorim A. M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics // Ann. Brasil. Acad. Sci. — 2002. — V. 74, N 3. — P. 433–436.
4. Еремин А. Н. Кинетическая характеристика внеклеточных каталаз грибов *Penicillium piceum* F-648 и их вариантов, адаптированных к пероксиду водорода // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 4. — С. 374–380.
5. Гесслер Н. Н., Соколов А. В., Быховский В. Я., Белозерская Т. А. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каратиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса // Там же. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 237–242.
6. Буценко Л. М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
7. Лобанок А. Г. Биотехнология микробных энзимов // Наука и инновации. — 2011. — № 1 (95). — С. 66–69.
8. Михайлова Р. В., Осока О. М., Лобанок А. Г. Образование внеклеточной каталазы видами рода *Penicillium* // Микол. фитопатол. — 2001. — Т. 35. — Вып. 3. — С. 43–46.
9. Fraaije M., Roubroeks H. P., Hagen W. R. et al. Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum* // Eur. J. Biochem. — 1996. — V. 235. — P. 192–198.
10. Kurakov A. V., Kupletskaya M. B., Skrynnikova E. V., Somova N. G. Search for micromycetes producing extracellular catalase and study of conditions of catalase synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. — 2001. — V. 37, N 1. — P. 59–64.
11. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручн. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
12. Fedotov O. V. Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications. — Tbilisi: Myza, 2007. — P. 125–126.
13. Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., Stalpers J. A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. — Wallingford, CAB International, 2001. — 655 p.
14. Пат. 39243 А UA, МПК 7C12N9/58. Спосіб визначення каталазної активності базидіоміцетів / Федотов О. В., Гавриленко Г. В. — Заявл. 21.11.2000; Опубл. 15.06.2001, Бюл. № 5.
15. Мусиенко М. М., Паршикова Т. В., Славный П. С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений — К.: Фитосоцицентр, 2001. — 200 с.
16. Государственная Фармакопея СССР. — XI изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
17. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ —
ПРОДУЦЕНТОВ КАТАЛАЗЫ**

*Т. Е. Волошко
О. В. Федотов*

Донецкий национальный университет,
Украина

E-mail: bio.graff@yandex.ua

Исследовали динамику роста и каталазную активность штаммов базидиомицетов при их поверхностном культивировании на глюкозо-пептонной среде. Объектами исследования были 57 штаммов, 5 из которых относятся к 5 видам порядка *Polyporales*, а 52 — к 7 видам порядка *Agaricales*. С целью изучения динамики роста использовали весовой метод определения накопления абсолютно сухой биомассы. Каталазную активность и содержание протеина в мицелии и культуральном фильтрате определяли спектрофотометрически и на основе полученных данных рассчитывали удельную каталазную активность. Установлены уровни накопления биомассы и каталазной активности исследованных штаммов на 9-е и 12-е сутки культивирования, а также способность большинства грибов к синтезу преимущественно внеклеточной каталазы. Результаты исследования позволили отобрать штаммы — активные продуценты каталазы, в частности *F. velutipes* F-2 и *P. ostreatus* P-208, которые являются перспективными для использования в биотехнологии получения препаратов энзимов.

Ключевые слова: базидиомицеты, каталазная активность.

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS
OF BASIDIOMYCETES — PRODUCERS
OF CATALASE**

*T. E. Voloshko
O. V. Fedotov*

Donetsk National University,
Ukraine

E-mail: bio.graff@yandex.ua

The dynamics of growth and catalase activity of 57 strains of basidiomycetes were investigated. Glucose-peptone medium was used for surface cultivation of fungi. The objects of study were 57 strains, 5 of which belongs to 5 species of the order *Polyporales*, and others do to 7 species of the order *Agaricales*. The weight measurement to estimate accumulation of absolutely dry biomass was used to study growth rates. The spectrophotometric methods were used for determination of catalase activity and protein content in mycelium and culture filtrate. The specific catalase activity was calculated based on this data. The levels of biomass accumulation and catalase activity of the strains on the 9-th and 12-th days of cultivation and ability of the most fungi to synthesize mainly extracellular catalase were determined. Individual variability of the strains was shown. The results allowed selecting the strains — active producers of catalase, including *F. velutipes* F-2 and *P. ostreatus* R-208, which are perspective for use in biotechnology of enzyme preparations.

Key words: basidiomycetes, catalase activity.