УДК 582.28:577.158

СКРИНІНГ ШТАМІВ БАЗИДІОМІЦЕТІВ — ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРОКСИДАЗИ

Т. Є. Волошко
О. В. Федотов

Донецький національний університет, Україна

E-mail: bio.graff@yandex.ua

Отримано 26.06.2012

Наведено результати вивчення пероксидазної активності штамів ксилотрофних базидіоміцетів у динаміці росту за поверхневого культивування на рідкому глюкозопептонному середовищі. Об'єктами дослідження були 57 штамів, 5 із яких належать до 5 видів порядку *Polyporales*, а 52 — до 7 видів порядку *Agaricales*. З метою пошуку активних продуцентів пероксидази штами культивували поверхнево на рідкому глюкозопептонному середовищі. Накопичення абсолютно сухої біомаси визначали ваговим методом, вміст водорозчинних протеїнів та пероксидазну активність — спектрофотометричними методами. За результатами досліджень встановлено рівень накопичення абсолютно сухої біомаси та пероксидазної активності штамів на 9- та 12-ту добу росту. Це дало змогу відібрати штами, зокрема *Agrocybe cylindracea* 167, *Pleurotus ostreatus* Р-кл, *Agrocybe cylindracea* 960 та 218, з високою пероксидазною активністю як у міцелії, так і в культуральному фільтраті. Як активні продуценти пероксидази ці штами можуть бути використані в біотехнології одержання препаратів ензимів.

Ключові слова: базидіоміцети, пероксидазна активність, міцелій, культуральний фільтрат.

Одержання біологічно активних речовин (БАР), синтезованих грибами, та створення на їх основі високоефективних нетоксичних лікарських препаратів чи компонентів харчових продуктів є актуальним завданням сучасної біотехнології [1–3].

Гриби, у тому числі й базидіоміцети, здатні до синтезу БАР широкого спектра дії. Перевага останніх перед мікроміцетами полягає у відсутності спороношення на вегетативній стадії росту, здатності накопичувати продукти біосинтезу в культуральному фільтраті та зростати на легкодоступних середовищах, зокрема на відходах промисловості та сільського господарства [4–6]. З огляду на це особливий інтерес становлять дереворуйнівні базидіоміцети, яким належить головна роль у деструкції лігноцелюлозного комплексу. Як наслідок, ксилотрофи, порівняно з іншими групами грибів, мають найбільш розвинений ензиматичний апарат [7–9].

Пероксидази (КФ 1.1.11.7) — це ензими класу оксидоредуктаз, що каталізують окиснення різних електронодонорних субстратів за допомогою H_2O_2. Відомо, що пероксидаза має не лише пероксидазні, а й оксидазні властивості: каталізує окиснення низки сполук за рахунок неактивованого молекулярного кисню. Наявні експериментальні дані свідчать про те, що пероксидаза пов'язана з багатьма метаболічними перетвореннями, що відбуваються в клітинах. Зокрема, цей ензим бере активну участь у процесах делігніфікації деревини і регуляції процесів пероксидного окиснення ліпідів, що може бути покладено в основу розроблення нових енергоощадних технологій перероблення деревини [9, 10].

Пероксидази набули широкого практичного застосування і слугують основним реагентом у медичних діагностичних тест-системах імуноензимного аналізу та препаратах для лікування низки вірусних, бактеріальних і онкологічних захворювань [11, 12]. Цей ензим також застосовують у фундаментальних дослідженнях в галузі біотехнології і медицини, загальної біології та екології, він є основою біосенсорів, хемі- та біолюмінесцентних датчиків [13]. Наукові розробки стали базою широкого використання пероксидази в різних галузях промисловості [12, 14].

Унікальні властивості цього ензиму, розчинність у воді, висока специфічність за окисником, стійкість під час зберігання, широкий спектр застосування і висока вартість чистого препарату стимулювали активний пошук нових джерел його одержання.

Метою роботи був скринінг штамів базидіоміцетів — активних продуцентів пероксидази.

Матеріали і методи

Використовували міцелій та культуральний фільтрат 57 штамів 12 видів базидіальних грибів (відділ *Basidiomycota*). Серед досліджених культур до порядку *Polyporales* належать 5 штамів: *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, а до порядку *Agaricales* — 52 штами: *Agrocybe cylindracea* (DC.) Maire 167, 218, 960 (шифр штамів збігається з номером в ІВК — Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України), *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.) Quйl. 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-12к, 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 плодових тіл базидіоміцетів, зібраних в різних місцевостях Донецької області, систематичне положення встановлено згідно з літературою [15–17]. Штами зберігаються в колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету.

З метою вивчення пероксидазної активності (ПА) дослідні штами культивували поверхнево в колбах Ерленмеєра на глюкозопептонному живильному середовищі (ГПС з вихідним pH 6,5±0,2 од.) об'ємом 50 мл такого складу (г/ л): глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; $КН_2PO_4$ — 0,6; $К_2HPO_4$ — 0,4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $CaCl_2$ — 0,05; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001. Інокулюмом слугували 10-денні міцеліальні культури штамів на сусло-агарі. Температура культивування 27±0,5 °С. Строк ферментації становив 12 діб, що зумовлено недоцільністю довгострокового культивування продуцентів та максимумами ПА саме в період експоненційного росту, що доведено у попередніх дослідженнях [12]. Визначення ростових показників та ПА проводили на 9- та 12-ту добу культивування досліджуваних штамів, використовуючи гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ). МГ та КФ готували так. Міцелій при 5±1 °С відділяли від культуральної рідини фільтруванням, додатково підсушували на фільтрувальному папері і охолоджували до 1±0,5 °С. Частину підготовленого міцелію використовували для визначення абсолютно сухої біомаси (АСБ) ваговим методом [17]. Для цього його висушували при 105 °С в бюксах до постійної маси в сушильній шафі 2В-151 (Росія) та зважували на аналітичних вагах ТВЕ-0.21 (Україна). Другу частину підготовленого міцелію гомогенізували, розтираючи в охолодженій ступці з додаванням дистильованої води у співвідношенні 1:10. Отриману суміш центрифугували на рефрижераторній центрифузі ЦЛР-1 (Росія) при 5±1 °С за відцентрового прискорення 2 000 *g* протягом 10 хв. З метою перевірки повноти екстракції пероксидази з міцелію у супернатант — водну витяжку операцію повторювали до мінімальних значень ПА осаду. Пероксидазну активність визначали у водній витяжці гомогенату міцелію (на одиницю маси, г) та в культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, мл). Метод базується на вимірюванні за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 (Росія) за довжини хвилі 460 нм у кюветі 10 мм, інтенсивності забарвлення продукту окиснення *о*-діанізидину пероксидом водню. Одиниця активності пероксидази відповідає кількості ензиму, що окиснює 1 мкм *о*-діанізидину за 1 хв. ПА мікологічного матеріалу розраховували за формулою [16]:

$$ПА = \frac{E \cdot V_1}{K_1 \cdot K_2 \cdot V_2 \cdot t} \cdot p,$$

де E — екстинкція; V_1 — об'єм забарвленої проби; V_2 — об'єм КФ або МГ; K_1 — коефіцієнт мікромолярної екстинкції (0,0128); K_2 — коефіцієнт для перерахунку мл у л (1 000); t — час інкубації (5 хв); p — розведення.

Питому пероксидазну активність ($ПА_{ПТ}$) розраховували за формулою:

$$ПА_{ПТ} = ПА / С_Б,$$

де $С_Б$ — концентрація протеїну в мг в 1 мл культурального фільтрату або гомогенату міцелію.

Вміст водорозчинного протеїну в міцелії та КФ визначали методом Лоурі–Хартрі [17].

Дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку виконували з використанням програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. З метою з'ясування впливу часу культивування на ріст та ПА культур базидіоміцетів здійснено однофакторний дисперсійний аналіз із застосуванням програми *Dispersion.exe*, порівняння дат — за методом Дункана. Достовірною вважали

різницю за рівня вірогідності $P > 0,95$ [19]. Експериментальні дані піддавали статистичній обробці, розраховуючи середнє значення з поправкою на стандартну похибку і порівнюючи їх за критерієм Дункана (дані не порівнюють з контролем), рисунки виконано у вигляді гістограми із зазначенням вірогідного інтервалу.

Результати та обговорення

Результати визначення показника росту — накопичення біомаси штамами базидіоміцетів на 9- та 12-ту добу культивування на глюкозопептонному середовищі з метою вивчення каталазної активності цих культур більш докладно подано в попередніх публікаціях (рис. 1). Слід, однак, зазначити, що всі досліджені штами досягають максимуму накопичення абсолютно сухої біомаси на 12-ту добу культивування [15].

За швидкістю накопичення АСБ усі штами можна розділити на 3 умовні групи. Найпродуктивнішими за накопиченням АСБ вище 12 г/л є штами *F. velutipes* F-610, *P. eryngii* P-er та *P. ostreatus* D-140 і P-203. Для більшості (84%) культур характерним є накопичення біомаси в межах від 2 до 9 г/л. До третьої групи з мінімальними показниками АСБ нижче 2 г/л належать штами *F. fomentarius* T-10, *L. sulphureus* Ls-08, *P. citrinopileatus* P-citr та *P. ostreatus* P-192 і P-14. Отже, досліджені штами мають індивідуальні значення росту — накопичення біомаси в застосованих умовах культивування, що відображає їхню здатність до утилізації компонентів живильного середовища.

Разом з показниками росту визначали вміст протеїну та ПА у мікологічному матеріалі. Аналіз експериментальних даних показав позитивну кореляцію АСБ і вмісту протеїну в міцелії та КФ штамів базидіоміцетів на 9-ту і 12-ту добу їх культивування. Також зафіксовано позитивну кореляцію між вмістом протеїну і ПА міцелію для 79% та між вмістом протеїну і ПА КФ — для 96,5% культур. За отриманими показниками вираховували $ПА_{ПТ}$ міцелію (рис. 2) та культурального фільтрату (рис. 3) досліджуваних штамів базидіоміцетів.

Встановлено, що для 79% досліджених штамів характерною є позитивна кореляція $ПА_{ПТ}$ міцелію та швидкості накопичення АСБ: найвищий рівень цих обох показників зафіксовано на 12-ту добу культивування. Питома ПА міцелію для 7 штамів *P. ostreatus* (P-004, P-035, P-039, P-081, P-089, P-183, P-6v), штаму *F. hepatica* Fh-08, штаму *L. sulphureus* Ls-08, штаму *A. cylindracea* 167 та 2 штамів *F. velutipes* (F-104 і F-2) знижується з 9-ї до 12-ї доби ферментації. Максимум $ПА_{ПТ}$ КФ більшості штамів також відповідає найвищому рівню АСБ, тобто 12-й добі культивування. $ПА_{ПТ}$ КФ лише двох штамів, а саме штаму *P. ostreatus* P-035 та штаму *S. commune* Sc-10, знижується наприкінці терміну росту. Ймовірно, це пов'язано із субстратною регуляцією активності ензиму та індивідуальними характеристиками цих штамів.

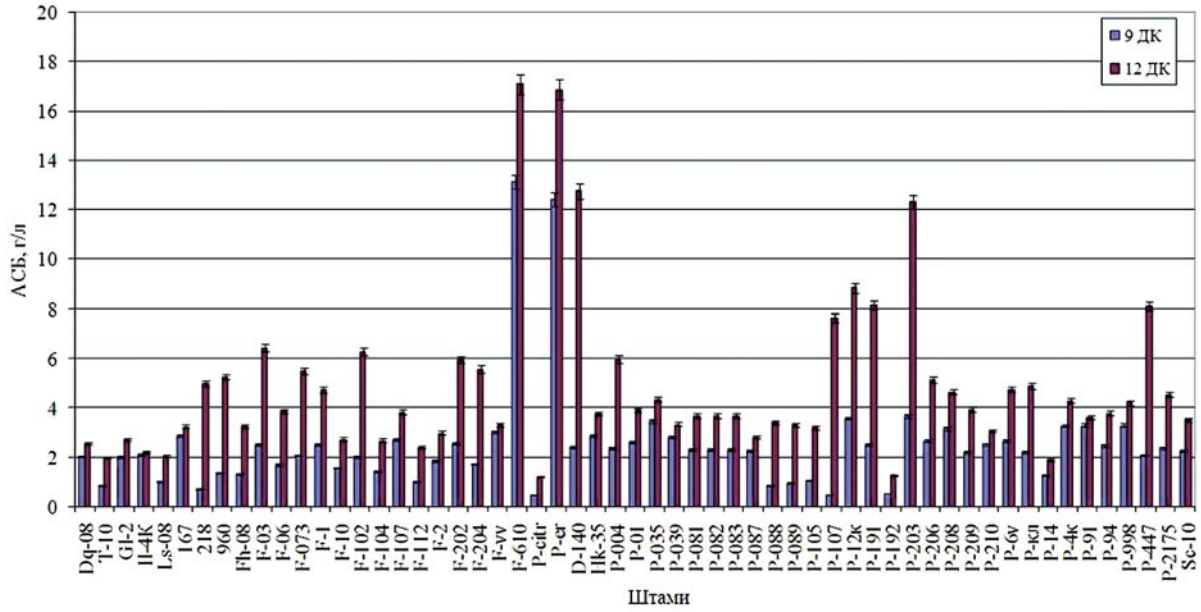

Рис. 1. **Накопичення біомаси штамами базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування**

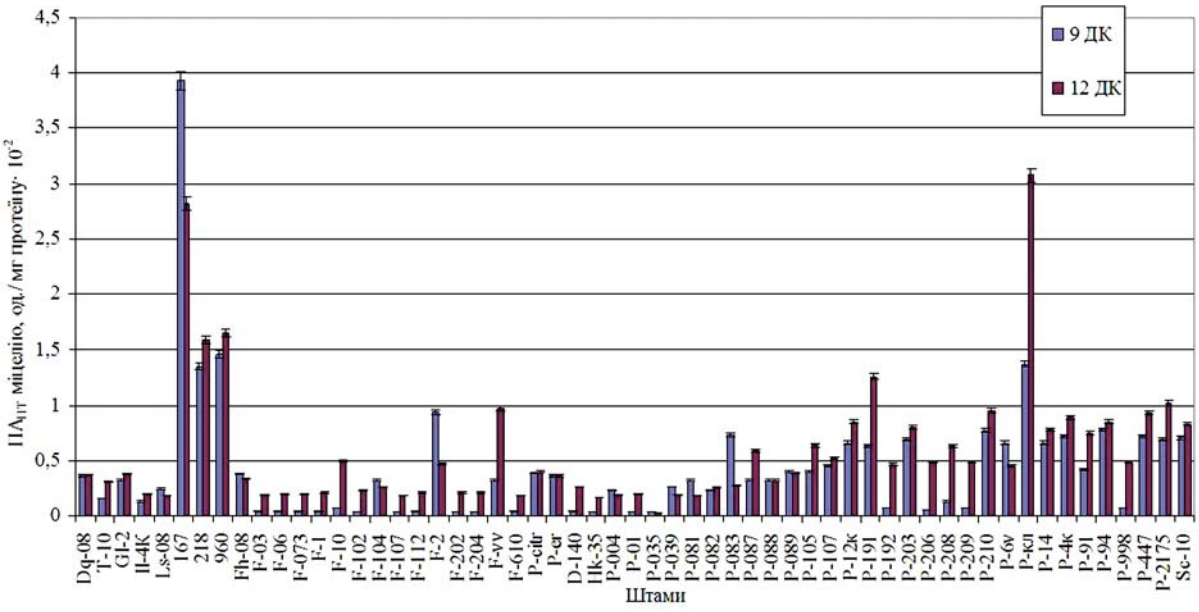

Рис. 2. **Питома пероксидазна активність міцелію штамів базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування**

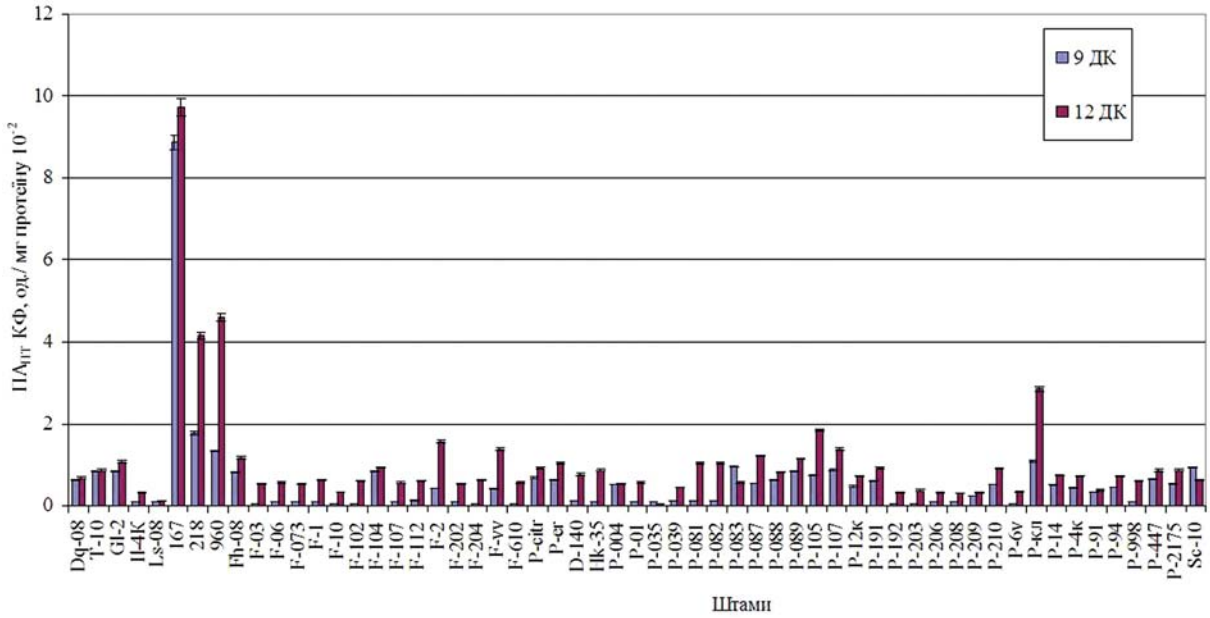

Рис. 3. **Питома пероксидазна активність культурального фільтрату штамів базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування**

За даними дослідження, 74% досліджених штамів базидіоміцетів характеризуються вищим рівнем питомої ПА у КФ порівняно з міцелієм. Для решти культур, серед яких більшість становлять штами *P. ostreatus*, показано більш високий рівень ПА$_{ПТ}$ в міцелії. Абсолютний максимум ПА$_{ПТ}$ як міцелію, так і КФ зафіксовано для штаму *A. cylindracea* 167 — 3,93 умовної одиниці (УО)/мг · 10^{-2} протеїну міцелію на 9-ту добу росту та 9,72 УО/мг · 10^{-2} протеїну КФ на 12-ту добу росту. Слід зазначити, що як продуцент міцеліальної, внутрішньоклітинної пероксидази важливим є штам *P. ostreatus* Р-кл., ПА міцелію якого в 2,87 раза нижча за активність штаму *A. cylindracea* 167 на 9-ту добу, і в 0,91 раза вища — на 12-ту добу культивування. Як продуценти екзогенної пероксидази можуть також бути використані штами *A. cylindracea* 960, 218 і штам

P. ostreatus Р-кл., ПА культурального фільтрату яких у 2,12, 2,34 та 3,40 раза, відповідно, нижча за активність штаму *A. cylindracea* 167 на 12-ту добу ферментації.

Для порівняння отриманих даних зазначимо, що $ПА_{ПТ}$ *crude*-екстракту оболонок насіння сої — одного з джерел промислового одержання ензиму пероксидази — становить 8,26 Е/ мг [20]. Досліджено ПА значної кількості штамів базидіальних грибів [21], однак ці результати складно порівняти з отриманими нами даними, оскільки вивчали інші види грибів та застосували різні методи визначення ПА.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу виявити культури базидіальних грибів, що характеризуються порівняно високою ПА як у міцелії, так і в культуральному фільтраті, а отже здатні до підвищеного синтезу пероксидази. Подальша оптимізація умов культивування уможливить застосування біосинтетично активних штамів у біотехнології як продуцентів цього ензиму.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Лобанок А. Г.* Биотехнология микробных ферментов // Наука и инновации. — 2011.– № 1 (95). — С. 66–69.
2. *Буценко Л. М.* Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
3. *Пирог Т. П.* Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
4. *Гаврилова В. П., Шамолина И. И., Белова Н. В.* Возможности нетрадиционного использования базидиомицетов в кожевенном и текстильном производстве // Биотехнология. — 2002. — № 5. — С. 74–80.
5. *Fedotov O. V.* Wood–destroying fungi as biosources of ferments for medicinal and nutritional purposes / Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications — Tbilisi: Myza, 2007. — P. 125–126.
6. *Wasser S. P.* Mushroom Pharmacy / McGraw Hill Encyclopedia of Science & Technology. 10 edition, NY, USA, 2010. — P. 678–683.
7. *Лисов А. В.* Гибридная Mn-пероксидаза гриба *Panus tigrinus* 8/18: Автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.04. / Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, 2005. — 16 с.
8. *Hofrichter M.* Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) // Enz. Microb. Technol. — 2002. — V. 30. — P. 454–466.
9. *Souza-Cruz P. B., Freer J., Siika-Aho M., Ferraz A.* Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips // Ibid. — 2004. — V. 34. — P. 228–234.
10. *Рогожин В. В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. — СПб: ГИОРД, 2004. — 240 с.
11. *Давыдова Г. Ф., Ермаков О. А., Панасенко А. И., Тищенко А. М.* Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза // Хим. раст. сырья. — 1998. — № 1. — С. 15–18.
12. *Преснова Г. В., Рубцова М. Ю., Егоров А. М.* Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена // Рос. хим. журн. — 2008. — Т. 3., № 2. — С. 60–65.
13. *Шугалей Н. А., Власова А. Б., Федорова А. Т. и др.* Поиск промышленных источников выделения растительных пероксидаз, области практического использования полученного фермента // Труды БГУ. — 2010. — Т. 5. — С. 53–61.
14. *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.
15. *Волошко Т. Є., Федотов О. В.* Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз // Мікробіол. біотехнол. – 2011. — № 4 (16). — С. 69–81.
16. *Рогожин В. В., Рогожина Т. В.* Физиолого-биохимические механизмы прорастания зерновок пшеницы // Вестн. Алт. гос. агр. ун-та. — 2011. — № 8 (82). — С. 17–21.
17. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modi cation of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — V. 48. — P. 422–427.
18. *Государственная* Фармакопея СССР. — XI изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
19. *Приседський Ю. Г.* Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів — Донецьк: ДонНУ, 2005. — 75 с.
20. *Федулов А. Л., Спиридович Е. В., Рахманько Е. М.* Выделение пероксидазы из оболочек семени сои // Труды БГУ. — 2006. — Т. 1. — С. 212–220.
21. *Решетникова И. А., Газарян И. Г., Веревкин А. Н. и др.* Поиск грибов — продуцентов пероксидазы // Микол. фитопатол. — 1992. — Т. 26 (5). — С. 383–387.

СКРИНИНГ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ

Т. Е. Волошко
О. В. Федотов

Донецкий национальный университет, Украина

E-mail: bio.graff@yandex.ua

Приведены результаты изучения пероксидазной активности штаммов ксилотрофных базидиомицетов в динамике роста. Объектами исследования являлись 57 штаммов, 5 из которых относятся к 5 видам порядка *Polyporales*, а 52 — к 7 видам порядка *Agaricales*. С целью поиска активных продуцентов пероксидазы штаммы культивировали поверхностным методом на жидкой глюкозопептонной среде. Накопление абсолютно сухой биомассы определяли весовым методом, содержание водорастворимых протеинов и пероксидазную активность — спектрофотометрически. По результатам исследований установлен уровень накопления абсолютно сухой биомассы и пероксидазной активности штаммов на 9-е и 12-е сут роста. Это позволило отобрать штаммы, а именно *Agrocybe cylindracea* 167, *Pleurotus ostreatus* Р-кл, *Agrocybe cylindracea* 960 и 218, с высокой пероксидазной активностью как в мицелии, так и в культуральном фильтрате. Как активные продуценты пероксидазы эти штаммы могут быть использованы в биотехнологии получения препаратов энзимов.

Ключевые слова: базидиомицеты, пероксидазная активность, мицелий, культуральный фильтрат.

SCREENING OF BASIDIOMYCETES STRAINS — PRODUCERS OF PEROXIDASE

T. E. Voloshko
O. V. Fedotov

Donetsk National University, Ukraine

E-mail: bio.graff@yandex.ua

The paper is devoted to the analysis of the research data peroxidase activity of the strains of xylotrophic basidiomycetes in the dynamics of the growth. The objects of study were 57 strains, 5 of which belongs to 5 species of the order *Polyporales*, and 52 of which belongs to 7 species of the order *Agaricales*. In order to search for active producers of peroxidase the strains were cultured by the surface method in a liquid glucose-peptone medium. The accumulation of oven-dry biomass was determined by the weight method. The content of soluble protein and peroxidase activity were determined by the spectrophotometry. The studies set the level of accumulation of oven-dry biomass and peroxidase activity of the strains in 9 and 12 days of growth. The results allowed selecting the strains, which are characterized by high levels of peroxidase activity in mycelium and in the culture filtrate, including *Agrocybe cylindracea* 167, *Pleurotus ostreatus* Р-кл, *Agrocybe cylindracea* 960 and 218. These strains which are active producers of peroxidase may be used in the enzyme preparations obtaining technology.

Key words: basidiomycetes, peroxidase activity, mycelium, culture filtrate.