

О.В. Федотов

ДИНАМІКА РОСТУ ТА КАТАЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ ШТАМІВ *FLAMMULINA VELUTIPES* (CURT.: FR.) SING. З ДЕНДРАРІЮ ДОНЕЦЬКОГО БОТАНІЧНОГО САДУ НАН УКРАЇНИ

зимовий опеньок, каталаза, ферментативна активність, антиоксиданти

Провідна роль в деструкції лігноцелюлозних субстратів належить дереворуйнівним грибам [16]. Їх ферментативний комплекс та біосинтетичні процеси досить лабільні, що робить їх перспективним об'єктом для біотехнології [8, 10, 11, 14]. Дереворуйнівний макроміцет зимовий опеньок (*Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.) належить до класу *Basidiomycetes*, порядку *Tricholomatales*, родини *Tricholomataceae* [6]. Гриб має антибактеріальні, антивірусні, антифунгальні, протипухлинні, імуномодуючі, гіпоглікемічні, тромболітичні властивості і представляє інтерес для грибівництва, фармакологічної і харчової промисловостей [1, 8, 17, 18]. Джерелом фармакологічних речовин, в тому числі і ферментів, можуть бути не лише плодові тіла, вирощені на щільних субстратах, але й міцеліальна біомаса, яку можна отримувати сучасними біотехнологічними методами культивування на рідких середовищах [1]. Переважна кількість видів макроміцетів на території Донбасу є малодослідженими. Для створення штамового різноманіття необхідна їх інтродукція в культуру, що дасть змогу здійснити скринінг і виявити перспективні штами для біотехнологічного використання. Відомий зв'язок ферментативної активності з таксономічним положенням і екологічним типом грибів, в тому числі з характером гнилі деревини, яку вони причиняють, та з місцем і субстратом їх існування [3, 16]. Фермент каталаза є одним з основних компонентів захисної антиоксидантної системи клітин майже всіх аеробів та багатьох факультативних анаеробів. Каталаза необхідна для детоксикації H_2O_2 , що утворюється при біосинтезу. Цей фермент використовують в харчовій, текстильній, шкіряній та електронній промисловостях, застосовують в медицині в якості діагностичного засобу [7, 9]. Є перспективні розробки з використанням речовин, що мають антиокисні властивості [7, 9, 15]. Слід відмітити, що біосинтез та властивості грибних каталаз практично не вивчені, а літературні дані стосуються внутрішньоклітинних каталаз мікробного і тваринного походження.

Мета роботи – вивчення під час культивування росту та каталазної активності (КА) штамів F-1, F-3, F-4, F-7, F-8, F-9, F-03, F-04 *Flammulina velutipes* з дендрарію Донецького ботанічного саду НАН України (ДБС).

Плодові тіла зимового опенька були зібрані в дендрарії ДБС у вересні – листопаді 1998–2002 років. Гриб мешкав на деревині мертвих чи ушкоджених листяних дерев переважно видів роду *Acer* L.: *A. hyrcanum* Fisch. et Mey. – штам F-3, *A. pseudoplatanus* L. – штами F-1, F-4 і *A. negundo* L. – штами F-7, F-8, F-9 [4]. Деякі плодові тіла *Flammulina velutipes* - штами F-03 і F-04 були зібрані з трухлявих пнів чи з горілих залишків дерев, систематичне положення яких неможливо встановити. Чисті міцеліальні культури *Flammulina velutipes* отримували виділенням тканинних ізолятів з свіжезібраних плодових тіл та підтримували на агаризованих живильних середовищах методом пересівів [2, 5, 6]. Штами зберігаються в колекції чистих міцеліальних культур кафедри фізіології рослин Донецького національного університету.

Для дослідження каталазної активності культур *Flammulina velutipes* штами вирощували в колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл, що містили 50 мл глюкозо-пептонового середовища з

початковим рН=5,0. Гриб культивували в термостаті при температурі 27,5°C. На 5, 10, 15, 20, 25-ту добу росту штамів визначали біомасу міцелію, зміну рН живильного середовища та рівень каталазної активності. Ріст штамів оцінювали за накопиченням біомаси (абсолютно сухий міцелій) ваговим методом [5]. Каталазну активність визначали у культуральному фільтраті та гомогенаті міцелію (МГ) за методом, який заснований на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 410 нм супроти нульової проби з дистильованою водою. Каталазну активність розраховували за формулою [12]:

$$E = (A_k - A_d) \cdot V \cdot t \cdot k \cdot p \text{ (мкат/л)},$$

де E – активність каталази (мкат/ л), A_k та A_d – екстинкція контрольної та дослідної проб,
 V – об'єм проби, що вносили (0,1 мл),
 t – час інкубації (600 с),
 k – коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню, що дорівнює $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 p – коефіцієнт розведення.

Дослід проводили у триразовій повторності. Результати дослідження обробляли за методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх величин проводили за методом Дункана [13].

Динаміка накопичення біомаси дослідними штамми гриба *Flammulina velutipes*, кислотності культуральної рідини та каталазної активності міцелію під час ферментації наведені у таблиці.

За ростовим показником – накопиченням біомаси – досліджені штамми між собою достовірно не відрізняються. Штами F-1 і F-4 накопичують найбільшу біомасу на 10–20-ту добу культивування, при цьому різниця між середніми не є вірогідною. На 25-ту добу культивування відбувається вірогідне зниження біомаси цих штамів. Накопичення найбільшої біомаси штамом F-7 зареєстровано на 15–25-ту добу культивування, різниця між середніми не є вірогідною. Штами F-03, F-04 ростуть більш повільно та накопичують найбільшу біомасу, подібно штаму F-7, на 15–25-ту добу культивування, різниця між середніми не є вірогідною. Вірогідного зниження біомаси штамів F-7, F-8, F-03 і F-04 в умовах досліду не спостерігали. На 5-ту і 25-ту добу культивування розходження в значеннях біомаси між штамми F-7, F-8, F-03 і F-04 не є вірогідними. Також не є вірогідною і різниця між середніми даними біомаси штамів F-1 і F-7 у 10-денному віці і штамів F-03 і F-1 на 15-ту і 20-ту добу культивування. В інших випадках спостерігали вірогідну різницю між середніми даними біомаси досліджених штамів. В п'ятиденному віці досліджені штамми *Flammulina velutipes* мали низький рівень накопичення біомаси, що не перевищував 1,95 г/ л, різниця між середніми тут не є вірогідною.

Результати експерименту свідчать про те, що рівень кислотності культуральної рідини при вирощуванні всіх штамів спочатку знижується та набуває мінімальних значень у 15-денному віці міцелію, після чого зростає до максимуму на 25-ту добу росту.

Каталазна активність культуральної рідини під час 25-денного росту штамів *Flammulina velutipes* не виявлена. Рівень активності каталази міцелію штамів вірогідно не розрізнявся в віці 5-10-ти та 15-25-ти діб. Вірогідно найвищі значення каталазної активності міцелію на 5-ту добу культивування мали штамми F-9, F-1 та F-4. Мінімальний рівень КА міцелію спостерігали у штамів F-03 і F-7. Найнижче значення КА міцелію штаму F-8 серед досліджених в цьому віці культур не є вірогідним. Майже для всіх штамів характерне зниження активності каталази в віці від 5-ти до 10-ти діб. Для штамів F-9, F-1, F-4 воно є вірогідним, а для штамів F-04, F-3, F-8 – навпаки. Для штамів F-03 та F-7 спостерігали вірогідне підвищення рівня КА. При порівнянні КА 10-денного міцелію бачимо, що її максимум спостерігається у штамів F-7 і F-03, а мінімум – у штаму F-8. У віці від 10-ти до 15-ти діб каталазна активність міцелію вірогідно зростає для всіх

Таблиця. Динаміка росту, рН живильного середовища та каталазної активності міцелію штамів *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.

Штам	Вік культури, доба	Біомаса, г/л	рН	КА МГ*, мкат/л · 10 ³
		М ± m		М ± m
F-1	5	1,42 ± 0,20	4,83	828,06 ± 71,37
	10	3,29 ± 0,12	4,33	546,12 ± 33,52
	15	3,66 ± 0,28	4,28	1305,36 ± 91,19
	20	3,17 ± 0,15	4,98	1178,82 ± 52,86
	25	2,30 ± 0,09	5,65	1365,38 ± 24,01
F-3	5	1,03 ± 0,13	4,95	600,21 ± 87,19
	10	2,87 ± 0,16	4,45	528,64 ± 37,33
	15	3,21 ± 0,31	4,30	1028,58 ± 87,50
	20	3,06 ± 0,13	4,92	982,82 ± 37,24
	25	2,09 ± 0,67	5,81	1007,30 ± 84,10
F-4	5	1,27 ± 0,18	5,00	733,34 ± 82,00
	10	3,31 ± 0,21	4,64	524,89 ± 51,20
	15	3,73 ± 0,12	4,37	1350,06 ± 98,67
	20	3,21 ± 0,09	5,05	1205,32 ± 48,87
	25	1,96 ± 0,13	5,91	1391,08 ± 73,34
F-7	5	1,16 ± 0,11	5,00	508,08 ± 40,18
	10	3,01 ± 0,10	4,62	792,54 ± 79,85
	15	4,57 ± 0,15	4,38	1198,80 ± 88,16
	20	4,26 ± 0,27	4,75	1236,54 ± 47,86
	25	4,00 ± 0,57	6,38	1385,28 ± 58,06
F-8	5	1,24 ± 0,21	5,01	420,09 ± 51,60
	10	2,98 ± 0,16	4,48	384,58 ± 26,67
	15	3,63 ± 0,09	4,27	1231,12 ± 96,17
	20	3,15 ± 0,16	4,80	1236,54 ± 97,86
	25	3,01 ± 0,31	6,12	1408,78 ± 91,13
F-9	5	1,22 ± 0,04	4,78	828,06 ± 81,04
	10	3,28 ± 0,11	4,35	546,12 ± 33,52
	15	3,42 ± 0,27	4,30	1305,36 ± 91,19
	20	3,57 ± 0,31	5,10	1178,82 ± 52,86
	25	2,13 ± 0,12	5,85	1365,30 ± 24,01
F-03	5	1,95 ± 0,16	5,00	540,52 ± 84,16
	10	3,87 ± 0,12	5,02	709,42 ± 16,01
	15	4,06 ± 0,27	4,72	1315,38 ± 86,11
	20	3,99 ± 0,14	5,72	1185,48 ± 81,03
	25	3,07 ± 0,18	6,43	1144,56 ± 83,28
F-04	5	0,89 ± 0,04	4,99	620,10 ± 67,37
	10	2,67 ± 0,13	4,75	546,21 ± 33,52
	15	3,48 ± 0,15	4,65	1279,07 ± 76,59
	20	3,32 ± 0,12	5,82	978,76 ± 52,56
	25	3,96 ± 0,21	6,05	1295,03 ± 34,01

* Примітка: КА - каталазна активність, МГ - гомогенат міцелію;
М ± m - середнє арифметичне значення ± похибка.

без винятку штамів. За рівнем КА досліджені штами у 15-ти денному віці розподіляються таким чином: F-4, F-03, F-1, F-9, F-04, F-8, F-7 та F-3. При подальшому культивуванні на 20 добу КА штамів F-8 та F-7 вірогідно не змінюється і є найвищою серед усіх штамів в цьому віці; вірогідно набуває мінімальних значень у штамів F-4, F-1, F-9 і F-04. Коливання рівня КА штамів F-03 та F-3 в 20-денному віці не є вірогідним. По закінченні строку культивування, на 25 добу, каталазна активність штамів F-8, F-7, F-4 F-9, F-1 і F-04 знову вірогідно зростає до максимальних значень. Цікаво відмітити, що штам F-8 мав як найнижчу КА, що дорівнювала $384,6 \text{ мкат/ л} \cdot 10^3$ серед усіх штамів у 10-ти денному віці, так і найвищу КА – $1408,8 \text{ мкат/ л} \cdot 10^3$ – у 25-денному. Рівень КА міцелію штаму F-03 на відміну від інших штамів зменшується, різниця між 20- та 25-добовим віком не є вірогідною. Каталазна активність штаму F-3 не змінюється. Значення каталазної активності 15-25-денного міцелію всіх штамів в два-три рази перевищують такі показники міцелію, який ріс 5-10 діб. Це скоріше за все пов'язане з відповіддю культур на стрес: несприятливі умови культивування – поступове зменшення поживних компонентів середовища [9]. Закономірність наявності двох чи більше максимумів ферментативної активності також відмічено при вивченні біосинтезу макроміцетами ферментів молокозсідальної і тромболітичної дій [8, 14]. Для всіх культур характерна вірогідна різниця КА міцелію між віком 5-10-ти і 15-25-ти діб.

В ході дослідів не встановлено залежності між накопиченням біомаси дослідними штамми гриба *Flammulina velutipes*, зміною каталазної активності міцелію та кислотності культуральної рідини під час ферментації.

Таким чином, аналіз отриманих даних дозволяє зробити наступні висновки. Інтродуковані штами *Flammulina velutipes* з дендрарію ДБС регулюють рівень кислотності культуральної рідини. Під час їх вирощування рН культурального фільтрату спочатку знижується та набуває мінімальних значень у 15-денному віці міцелію, після чого зростає до максимуму на 25-ту добу росту. За накопиченням біомаси досліджені штами між собою вірогідно не розрізняються. Каталазну активність культуральної рідини під час 25-денного росту штамів *Flammulina velutipes* не виявлено. Рівень активності каталази міцелію штамів вірогідно не розрізнявся в віці 5–10-ти та 15–25-ти діб. Значення каталазної активності 15–25-денного міцелію в два-три рази перевищують такі показники міцелію, який зростав 5-10 діб. Для всіх культур характерна вірогідна різниця КА міцелію в віці 5–10-ти і 15–25-ти діб. Не виявлено залежності між накопиченням біомаси дослідними штамми *Flammulina velutipes*, зміною каталазної активності міцелію та кислотності культуральної рідини під час культивування. Проведені дослідження довели, що культури *Flammulina velutipes* з дендрарію Донецького ботанічного саду здатні до синтезу міцеліальної каталази і мають певний рівень каталазної активності міцелію в умовах штучного вирощування. Це дозволяє в подальшому провести порівняння їх ферментативної активності зі штамми, що виділені з плодкових тіл із екологічно несприятливих, промислово забруднених місцезростань.

1. Бухало А.С., Соломко Е.Ф., Митропольська Н.Ю. Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями // Укр. ботан. жур. – 1996. – 53, № 3. – С. 192–201
2. Бухало А.С. Высшие базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наука, 1988. – 144 с.
3. Даниляк М.І., Решетников С.В. Лікарські гриби. Медичне застосування та проблеми біотехнології. – К.: Б.в., 1996. – 65 с.
4. Деревья и кустарники, культивируемые в Украинской ССР. Покрытосеменные. Справ. пособие / Под общ. ред. Н.А. Кохно– Киев: Наук. думка, 1986. – 720 с.
5. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.

6. Дудка И.А., Вассер С.П. Грибы. Справочник миколога и грибника. – Киев: Наук. думка, 1987. – 536 с.
7. Максименко А.В. Модифицированные препараты супероксиддисмутазы и каталазы для защиты сердечно-сосудистой системы и легких // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т. 113. – С. 351–365.
8. Методологические основы познания биологических особенностей грибов – продуцентов физиологически активных веществ и пищевых продуктов: Матер. II Междунар. конф. / Отв. ред. М.И. Бойко. – Донецк: Норд компьютер, 2002. – 186 с.
9. Михайлова Р.В., Осока О.М., Лобанок А.Г. Образование внеклеточной каталазы видами рода *Penicillium* // Микология и фитопатология. – 2001. – 35. - Вып. 3. – С. 43–46.
10. Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии (сборник статей). – М.: Изд-во Моск. гос. ун-та – ИД “Муравей”, 1998. – 379 с.
11. Соломко Э.Ф., Дудка И.А. Перспективы использования высших базидиомицетов в микробиологической промышленности. – М.: ВНИИСЭНТИ, 1985. – 48 с.
12. Пат. 39243 А. Україна, 7С12N9/58. Спосіб визначення каталазної активності базидіомицетів / О.В. Федотов, Г.В. Гавриленко. – № 2000116560, Заяв. 21.11.00; Опубл. 15.06.2001, Бюл. № 5. – 47 с.
13. Приседский Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.
14. Федотов О.В. Активные продуценты молокосвертывающих ферментов среди гименомицетов, их биологические особенности и перспективы применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1995, – 20 с.
15. Шамардин В.А., Кузьмин Ю.А., Каральник Б.В. Использование каталазы в иммуноферментных реакциях // Лабораторное дело. – 1988. – № 4. С. 67–68.
16. Eriksson K.-E., Blanchette R.A., Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. – Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. – 258 p.
17. Fedotov O., Bugrim E. Mycelia antioxidant activity of the strains of genera *Pleurotus* (Fr.) Kumm. and *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. // Успехи медицинской микологии. – М.: Нац. академ. микологии, – 2003. – 1. – С. 252–254.
18. Tardif A. La Mycotherapie où Les propriétés Medicinales des Champignons. – Paris, 2000. – 167 p.

Донецький національний університет

Надійшла 3.03.2003

УДК 582.284:616-008.831

Динаміка росту та каталазної активності штамів *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. з дендрарію Донецького ботанічного саду НАН України / О.В. Федотов // Промышленная ботаника. – 2003. – Вып. 3. – С. 126–130.

Вивчали ріст та каталазну активність (КА) штамів зимового опенька *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. під час культивування на глюкозо-пептоновому середовищі. Каталазну активність культурального фільтрату не зафіксовано; найвищі значення КА міцелію спостерігали в віці 15–25-ти діб.

UDC 582.284:616-008.831

Dynamics of growth and catalase activity of *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. strains of the dendrarium of the Donetsk Botanical Gardens of Nat. Acad. of Sci. of Ukraine / O.V. Fedotov // Industrial botany. – 2003. – V. 3. – P. 126–130.

Growth and catalase activity (CA) of *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) strains in the time of cultivation were studied. Catalase activity of the cultural filtrates was not marked; the highest data of the mycelium CA was observed on the 15–25-th day of cultivation.