

УДК 582.28:577.158

О.В. Федотов, Т.Є. Волошко,

**РОЗРОБКА СПОСОБІВ ОТРИМАННЯ І АНАЛІЗ ФЕРМЕНТНИХ  
ПРЕПАРАТІВ ПЕРОКСИДАЗ ТА КАТАЛАЗ ДЕЯКИХ ВИДІВ  
БАЗИДИОМІЦЕТІВ**

Донецький національний університет

e-mail: bio.graff@yandex.ua

Наводяться результати розробки способів отримання ферментних препаратів (ФП) пероксидаз та каталаз екстрацелюлярного та інтрацелюлярного походження з культур базидіоміцетів. Як продуценти оксидоредуктаз використовували штами *Flammulina velutipes* F-vv, *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208 та P-01, які культивували на модифікованих глюкозо-пептонних середовищах. Фракціонування ферментів проводили шляхом висолювання сульфатом амонію при 40-70% насичення для пероксидаз та 80% насичення – для каталаз. Отримані розчини фракцій білків піддавали подальшому очищенню шляхом діалізу та гель-фільтрації на гранулах Молселекту G-50 і G-75 та ліофільній сушці. Встановлено індивідуальні характеристики ФП – ферментативну активність, масовий процент вмісту протеїну та зв'язаних амінокислот і їх співвідношення в групах залежно від природи радикалів (амфотерності) білкових молекул. Виявлено, що штам *F. velutipes* F-vv є активним продуцентом інтрацелюлярної, а штам *A. cylindracea* 167 – екстрацелюлярної пероксидази. Активними продуцентами екстрацелюлярної каталази є штами *P. ostreatus* P-01 та P-208, а інтрацелюлярної – штам *F. hepatica* Fh-08. Розроблені способи отримання ферментних препаратів пероксидаз та каталаз екстра- та інтрацелюлярного походження дозволили виділити нові антиоксидантні ензими, які мають особисті властивості і перспективи використання у різних галузях промисловості та наукових дослідженнях.

Ключові слова: базидіоміцети, пероксидази, каталази, ферментні препарати.

О.В. Федотов, Т.Е. Волошко,

**РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ И АНАЛИЗ ФЕРМЕНТНЫХ  
ПРЕПАРАТОВ ПЕРОКСИДАЗ И КАТАЛАЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ  
БАЗИДИОМИЦЕТОВ**

Донецкий национальный университет

e-mail: bio.graff@yandex.ua

Приводятся результаты разработки способов получения ферментных препаратов (ФП) пероксидаз и каталаз экстрацеллюлярного и интрацеллюлярного происхождения из культур базидиомицетов. В качестве продуцентов оксидоредуктаз использовали штаммы *Flammulina velutipes* F-vv, *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208 и P-01, которые культивировали на модифицированных глюкозо-



пептонных средах. Фракционирование ферментов проводили путем высаливания сульфатом аммония при 40-70% насыщения для пероксидаз и 80% насыщения – для каталаз. Полученные растворы фракций белков подвергали дальнейшей очистке путем диализа и гель-фильтрации на гранулах Молселекта G-50 и G-75 и лиофильно высушивали. Установлены индивидуальные характеристики ФП – ферментативная активность, массовый процент содержания белка и связанных аминокислот и их соотношение в группах в зависимости от природы радикалов (амфотерности) белковых молекул. Установлено, что штамм *F. velutipes* F-vv является активным продуцентом интрацеллюлярной, а штамм *A. cylindracea* 167 – экстрацеллюлярной пероксидазы. Активными продуцентами экстрацеллюлярной каталазы являются штаммы *P. ostreatus* P-01 и P-208, а интрацеллюлярной – штамм *F. hepatica* Fh-08. Разработанные способы получения ферментных препаратов пероксидаз и каталаз экстра- и интрацеллюлярного происхождения позволили выделить новые антиоксидантные энзимы, которые имеют индивидуальные свойства и перспективы применения в различных отраслях промышленности и научных исследованиях.

*Ключевые слова:* базидиомицеты пероксидазы, каталазы, ферментные препараты.

O.V. Fedotov, T.E. Voloshko

**PRODUCING OF ENZYME PREPARATION  
AND ANALYSIS OF ENZYME PREPARATION OF PEROXIDASE AND  
CATALASE OF SOME SPECIES OF BASIDIOMYCETES**

*Donetsk National University*

*e-mail: bio.graff@yandex.ua*

A method for obtaining of enzyme preparations of enzyme preparations (EP) of peroxidases and catalases fungal extracellular and intracellular origin from cultures of Basidiomycetes was developed. The strains *Flammulina velutipes* F-vv, *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08 and *Pleurotus ostreatus* P-208 and P-01 were used as producers of oxidoreductases. Strains were grown on modified glucose-peptone media. Fractionation was carried out by salting out the enzymes with ammonium sulfate at 40-70% saturation of peroxidases and 80% of saturation - for catalase. These solutions protein fractions was further purified by dialysis and gel filtration on Molselekt granules G-50 and G-75. The enzyme solution was subjected to freeze-drying. The individual characteristics of the enzyme preparations were found. The individual characteristics of the enzyme preparations are the activity of enzymes, the protein content and amino-acid composition of enzyme preparations. It was established that strain *F. velutipes* F-vv was an active producer of intracellular and strain of *A. cylindracea* 167 was an active producer of extracellular peroxidase. The strains of *P. ostreatus* P-01 and P-208 were the active producers of extracellular catalase, and the strains of *F. hepatica* Fh-08 were active producers of intracellular catalase. The developed methods for producing of enzymes catalase and peroxidase preparations of extra-and intracellular origin provided new antioxidant enzymes, which have their own properties and application prospects in various sectors of industry and science research.

*Key words:* Basidiomycetes, peroxidases, catalases, enzyme preparation.

Масштабні дослідження грибів різних систематичних груп дозволили виявити серед них перспективні продуценти різноманітні біологічно активних речовин (Moore, 2001, Wasser, 2010). Зокрема, увагу науковців багатьох спеціальностей привертають базидіальні гриби. Це пов'язано зі значними успіхами у вивченні процесів їх метаболізму, створенні колекцій чистих культур, прогресом в технічному оснащенні процесів культивування та, як наслідок, можливістю широкого практичного використання (Соломко, 2000; Jordan, 2004; Fedotov, 2007).

Так, науковий і комерційний інтерес для промислового використання представляють оксидоредуктази базидіоміцетів, зокрема пероксидази та каталаза. Ці ферменти знайшли широке застосування, а саме: пероксидаза – використовується в якості діагностичного реагенту або маркерного ферменту в імуноферментному аналізі, як консервант в харчовій промисловості; каталаза – в якості компонента сорбенту для стабілізації препаратів крові, для холодної стерилізації молока, сиру, яєць, у процесах органічного синтезу, полімеризації каучуку тощо (Рогожин, 2011; Мирошніченко, 1992).

Проведені скринінгові дослідження показали здатність ксилотрофних базидіоміцетів до підвищеного синтезу ферментів всіх відомих класів та дозволили відібрати найбільш продуктивні в цьому відношенні штами (Волошко, Федотов, 2011). Ферменти, виділені з культурального фільтрату або міцелію вищих грибів мають низку переваг: вони є більш дешевими за тваринні препарати, нетоксичними порівняно з мікробними метаболітами, а методи їх отримання є більш економічно вигідними за отримання ферментів рослинного походження (Fedotov, 2007). Крім того, нові ензими можуть мати від'ємні характеристики – молекулярну масу і амінокислотну послідовність, оптимуми температури та рН дії, субстратну специфічність тощо (Федулов, 2006; Ngo, 2010).

Виходячи з вищезазначеного, метою роботи була розробка способів отримання ферментних препаратів пероксидаз та каталаз екстрацелюлярного та інтрацелюлярного походження з культур базидіоміцетів і визначення вмісту в них білків та їх амінокислотного складу.

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Як об'єкти дослідження використовували відібрані в попередніх роботах високопродуктивні штами базидіальних грибів *Flammulina velutipes* F-vv, *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208 та P-01 – продуценти каталаз та пероксидаз (Федотов, 2002; Волошко, 2011). Культури зберігаються у Колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету та депоновані у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК)



(Федотов, 2012). Штами культивували поверхнево при  $27\pm 1^\circ\text{C}$  на модифікаціях глюкозо-пептонного середовища (Федотов, 2002; Волошко, 2012). Інокулюм – 10-ти денні міцеліальні культури обраних штамів на сусло-агарі складав 5-7% від об'єму ГПС. Штами культивували протягом 12-15 діб, до досягнення культурою максимальної ферментативної активності.

Активність оксидоредуктаз міцелію та культурального фільтрату (КФ або CF) визначали спектрофотометричними методами: пероксидазну активність (POX activity) – за інтенсивністю забарвлення продукту окислення о-діанізидину  $\text{H}_2\text{O}_2$  та виражали в ум. од. кількості ферменту, яка каталізує окислення 1 мкмоль о-діанізидину за 1 хвилину (Рогожин, 2011); каталазну активність (CAT activity) – за забарвленням продукту реакції  $\text{H}_2\text{O}_2$  з молібдатом амонію та виражали у мкат, що відповідає кількості ферменту, яка бере участь у перетворенні 1 мкат перекису водню за 1 секунду при заданих умовах (Волошко, Федотов, 2011).

Концентрацію білку в міцелії та КФ визначали за методом Лоурі-Фоліна (Досон, 1991).

На основі отриманих результатів розраховували питому пероксидазну і каталазну активності за формулою:

$$A_{\text{пт}} = A / C_{\text{б}},$$

де:  $A_{\text{пт}}$  – питома активність відповідного ферменту,  $A$  – активність відповідного ферменту,  $C_{\text{б}}$  – концентрація білку.

Дослідження проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані піддавали статистичній обробці згідно керівництву (Приседський, 2005). Для оцінки статистичної значущості відмінностей використовували рівень вірогідності  $p < 0,05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Процес отримання ферментних препаратів екстра- та інтрацелюлярних каталаз та пероксидаз штамів базидіальних грибів *F. velutipes* F-vv, *A. cylindracea* 167; *F. hepatica* Fh-08, *P. ostreatus* P-208 та P-01 (рис. 1) включав наступні етапи.

На початковому етапі отримання ферментних препаратів грибних ензимів, штамми-продуценти культивували в оптимальних умовах. Після досягнення максимальної ферментативної активності, відділяли біомасу від культуральної рідини шляхом фільтрування. Клітини міцелію піддавали механічній деградації та екстрагували дистильованою водою 1:10. Фракціонування ферментів в екстракті міцелію (ЕМ) та КФ проводили шляхом розчинення сульфату амонію до 40-70% насичення для висолювання пероксидаз та 80% – каталаз.

Використовували цей метод завдяки високій розчинності у воді та стабілізуючій дії на білкову молекулу  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Фракцію білку, яка утворила осад, відділяли центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі. Потім

проводили первинну очистку отриманої білкової фракції за допомогою діалізу проти охолодженої дистильованої води.

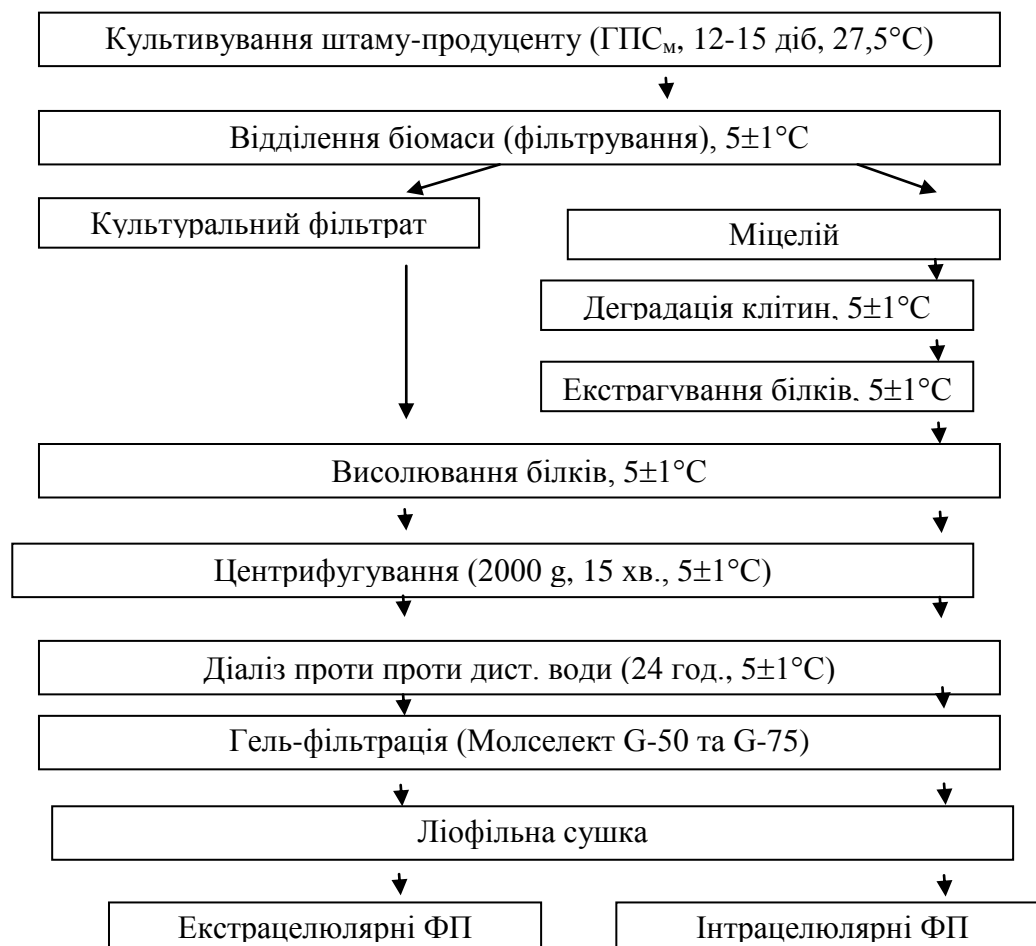


Рис. 1. Схема отримання ферментних препаратів екстра- та інтрацелюлярних каталаз та пероксидаз штамів базидіальних грибів

Для прискорення дифузії, розчинник декілька разів замінювали до повного очищення розчину білків від сульфату амонію. Завдяки осмосу, молекули розчинника призводили до часткового розведення дослідного розчину. Отримані фракції білків піддавали подальшому очищенню шляхом гель-фільтрації.

Завершальним етапом, білкові розчини піддавали ліофільній сушці, отримуючи таким чином ферментні препарати екстра- та інтрацелюлярного походження (ФП<sub>Е</sub> та ФП<sub>І</sub> або EP<sub>Е</sub> and EP<sub>І</sub>), які мали вигляд порошку від світло-сірого до світло-кремового забарвлення. Вихід ферментних препаратів



пероксидаз становив  $0,16 \pm 0,02$  г/ кг сирої маси міцелію та  $0,15 \pm 0,03$  г/ л КФ; а ФП каталаз –  $0,18 \pm 0,02$  г/ кг та  $0,19 \pm 0,03$  г/ л відповідно. Для ФП встановлено оптимуми рН і температурної дії, які коливаються в межах 4,5-6,0 і 27-30 °С відповідно для пероксидаз та 5,5-6,5 і 25-30 °С відповідно для каталаз.

Результати визначення пероксидазної та каталазної активностей ФП наведено в табл. 1.

**Таблиця 1. Пероксидазна та каталазна активність ферментних препаратів деяких штамів базидіоміцетів**

**Table 1. Peroxidase and catalase activity of enzyme preparations of some strains basidiomycetes**

Штам Strain	ПА, Е/ мг POX activity, E/ mg		КА, мкат /мг CAT activity, mcat / mg	
	ФП <sub>Е</sub>	ФП <sub>І</sub>	ФП <sub>Е</sub>	ФП <sub>І</sub>
	ЕР <sub>Е</sub>	ЕР <sub>І</sub>	ЕР <sub>Е</sub>	ЕР <sub>І</sub>
<i>F. velutipes</i> F-vv	$4,7 \pm 0,1$	$9,1 \pm 0,2$	$4077,9 \pm 67,0$	$1320,5 \pm 69,3$
<i>A. cylindracea</i> 167	$6,2 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$4081,8 \pm 104,8$	$942,7 \pm 40,5$
<i>F. hepatica</i> Fh-08	$1,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$	$4266,9 \pm 29,1$	$2010,2 \pm 35,8$
<i>P. ostreatus</i> P- 208	$0,2 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,1$	$9181,5 \pm 293,1$	$1010,3 \pm 10,3$
<i>P. ostreatus</i> P-01	$3,4 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	$9593,5 \pm 323,3$	$1493,6 \pm 70,6$

Аналіз отриманих даних показав, що штам *F. velutipes* F-vv є активним продуцентом інтрацелюлярної, а штам *A. cylindracea* 167 – екстрацелюлярної пероксидази. Активними продуцентами екстрацелюлярної каталази є штами *P. ostreatus* P-01 та P-208, а інтрацелюлярної – штам *F. hepatica* Fh-08.

Масовий процент вмісту білку і зв'язаних амінокислот в ферментних препаратах визначали за допомогою амінокислотного аналізатора моделі ААА-881, після кислотного гідролізу ФП. Результати цього аналізу для ФП пероксидаз надано у табл. 2 та ФП пероксидаз – табл. 3, в яких амінокислоти розташовані залежно від природи радикалів (амфотерності) білкових молекул. Дані подаються без зазначення похибки, оскільки представляють точні результати амінокислотного аналізу по одному зразку ферментного препарату відповідного ензиму екстра- та інтрацелюлярного походження кожного штаму.

Результати аналізу ФП пероксидаз (табл. 2) показали, що досліджувані препарати містять білок в межах від 37,8% (*P. ostreatus* P-01) до 54,8% (*P. ostreatus* P-208).

Щодо амінокислотного складу досліджених білків, то з групи неполярних

гідрофобних амінокислот на увагу заслуговують фенілаланін та лейцин, вміст яких тут є найбільший. Високий рівень вмісту валіну у ФП пероксидаз штаму *P. ostreatus* P-208, скоріше за все, пов'язаний з внесенням цієї амінокислоти до складу модифікованого ГПС, задіяного для культивування цього штаму. Також треба зазначити, що наявність оксипроліну у складі білків, на відміну від результатів аналізу ферментних препаратів молокозсідальної дії (Федотов, 2002), не виявлено.

В групі полярних, гідрофільних амінокислот високий вміст в ФП має гліцин (Глі). Це пов'язане, скоріше за все, з внесенням у живильне середовище ферментативного пептону, який має у складі до 2,22% цієї амінокислоти від вмісту азоту.

Досліджені білки ФП можна було б віднести до кислих вже тільки за високим вмістом негативно заряджених аспарагінової (Асп) і глутамінової (Глу) амінокислот. Але це припущення вірне в тому разі, коли в білках вони не знаходяться у вигляді глутаміну і аспарагіну, що, при кислотному гідролізі, довести не можливо. Побічним показником переваги у структурі білків ФП пероксидаз кислих амінокислот може бути те, що їх 0,1%-ві водні розчини мають рівень рН, що коливається в межах від 4,8 од. (*F. hepatica* Fh-08) до 5,8 од. (*P. ostreatus* P-01).

Вміст у ферментних препаратах основних, позитивно заряджених амінокислот аргініну (Арг) та гістидину (Гіс) є значно нижчим, ніж попередніх, і не може суттєво впливати на природу досліджуваного протеїну.

**Таблиця 2. Вміст білку і амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз деяких штамів базидіоміцетів**

**Table 2. The content of protein and amino acid composition of the enzymes peroxidases of some strains of basidiomycetes**

Амінокислот а Amino acid	Штам The strain									
	<i>F. velutipes</i> F-vv		<i>A. cylindracea</i> 167		<i>F. hepatica</i> Fh-08		<i>P. ostreatus</i> P-208		<i>P. ostreatus</i> P-01	
	ФП <sub>Е</sub> EP <sub>Е</sub>	ФП <sub>І</sub> EP <sub>І</sub>	ФП <sub>Е</sub> EP <sub>Е</sub>	ФП <sub>І</sub> EP <sub>І</sub>	ФП <sub>Е</sub> EP <sub>Е</sub>	ФП <sub>І</sub> EP <sub>І</sub>	ФП <sub>Е</sub> EP <sub>Е</sub>	ФП <sub>І</sub> EP <sub>І</sub>	ФП <sub>Е</sub> EP <sub>Е</sub>	ФП <sub>І</sub> EP <sub>І</sub>
Вміст амінокислот, мг % Content amino acids, mg %										
Ала	2,32	2,15	2,14	2,68	3,49	3,61	3,18	3,06	3,21	2,67
Вал	5,34	4,06	5,31	4,06	5,19	5,02	5,63	4,65	3,78	3,93
Лей	8,87	8,91	9,22	8,71	9,98	9,65	8,47	9,02	9,32	8,51
Лє	5,56	6,25	4,61	4,89	6,34	6,39	3,69	3,41	3,66	3,41



О-про	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Про	2,93	4,60	3,16	4,09	4,22	4,69	3,42	3,68	3,31	3,94
Фен	10,0	4,93	7,90	7,91	7,88	7,88	8,09	9,29	9,20	9,73
	3									
Мет	5,57	2,07	3,22	1,98	4,61	3,16	1,76	1,75	1,62	1,87
Глі	4,80	7,01	4,43	5,61	4,84	5,02	4,02	4,67	3,93	2,79
Сер	3,53	3,00	3,79	3,00	3,79	3,81	3,86	3,91	4,09	3,28
Тре	3,00	3,99	3,67	4,11	4,96	3,99	3,98	4,22	3,44	3,65
Цис	1,37	1,45	0,95	1,06	2,80	2,83	0,91	1,35	1,07	0,29
Тир	9,72	7,84	8,97	8,47	7,46	8,19	8,32	8,83	8,76	9,09
Асп	12,7	14,0	14,0	15,0	17,1	17,9	13,7	14,3	15,5	15,3
	0	8	1	0	3	6	3	8	6	8
Глу	10,7	12,3	11,4	11,9	14,4	14,8	11,2	8,12	13,1	12,4
	6	9	9	7	9	1	6		1	0
Ліз	6,86	8,58	7,23	8,77	0,92	0,87	15,1	15,2	8,12	9,73
							2	7		
Арг	4,04	5,74	6,37	6,31	1,23	1,40	4,96	5,66	4,78	5,98
Гіс	2,60	2,95	3,53	1,38	0,67	0,72	2,78	1,79	3,04	3,35
% білку в ФП	39,6	50,4	42,6	52,8	39,9	46,6	46,1	54,8	37,8	42,4
	3	9	6	0	3	8	1	0	2	1

Таблиця 3. Вміст білку і амінокислотний склад ферментних препаратів каталаз штамів базидіоміцетів

Table 3. The content of protein and amino acid composition of the enzymes catalases of strains of basidiomycetes

Амінокислота Amino acid	Штам The strain									
	<i>F. velutipes</i>		<i>A. cylindracea</i>		<i>F. hepatica</i>		<i>P. ostreatus</i>		<i>P. ostreatus</i>	
	F-vv		167		Fh-08		P-208		P-01	
	ФП	ФП	ФП	ФП	ФП	ФП	ФП	ФП	ФП	ФП
	КФ	міцел	КФ	міцел	КФ	міцел	КФ	міцел	КФ	міцел
	ЕР <sub>E</sub>	ію	ЕР <sub>E</sub>	ію	ЕР <sub>E</sub>	ію	ЕР <sub>E</sub>	ію	ЕР <sub>E</sub>	ію
		ЕР <sub>I</sub>		ЕР <sub>I</sub>		ЕР <sub>I</sub>		ЕР <sub>I</sub>		ЕР <sub>I</sub>
	Вміст амінокислот, мг % Content amino acids, mg %									
Ала	5,1	4,52	5,1	4,72	5,1	4,89	4,6	3,48	4,5	3,65
	4		5		5		6		2	
Вал	6,2	5,95	6,3	6,47	4,6	3,46	4,6	5,21	5,0	5,21
	9		8		0		8		5	



Лей	5,0 7	5,36	5,2 3	5,64	4,7 7	5,20	6,5 5	6,55	6,5 4	6,71
Ле	4,8 1	5,79	4,9 2	5,81	5,4 4	5,23	6,0 1	5,74	5,9 4	5,30
Про	4,8 6	6,20	5,1 0	4,67	4,9 8	4,78	4,8 7	5,26	4,6 6	5,04
Фен	11, 69	7,32	12, 37	10,29	10, 19	9,88	6,0 0	5,37	5,8 9	5,01
Мет	2,0 8	1,71	2,6 1	2,03	3,0 3	2,97	1,9 6	0,99	3,1 8	1,60
Глі	4,2 9	3,93	3,6 6	3,00	4,6 3	3,75	2,4 9	3,25	2,4 5	2,46
Сер	3,8 4	3,84	3,8 5	3,86	4,0 9	3,81	3,6 7	3,90	3,0 0	3,85
Тре	6,3 6	5,67	6,3 9	5,51	6,4 1	5,69	4,0 3	5,78	3,6 7	4,53
Цис	1,4 7	0,96	1,9 1	1,23	3,1 5	1,24	2,1 4	1,31	1,2 0	0,54
Тир	5,6 4	6,02	5,4 2	5,89	4,9 7	2,42	7,1 8	5,25	6,2 6	4,93
Асп	12, 95	14,33	13, 68	13,72	15, 97	19,83	13, 61	15,97	15, 83	17,68
Глу	12, 92	12,18	11, 65	12,12	16, 31	18,86	14, 24	16,39	19, 65	19,19
Ліз	6,2 1	5,34	6,0 6	6,02	2,0 1	3,16	4,0 9	6,36	4,2 2	5,34
Арг	4,9 7	7,19	3,5 4	5,13	3,6 3	3,09	8,0 6	7,84	5,9 2	5,56
Гіс	1,4 1	3,69	2,0 8	3,89	0,6 7	1,74	5,7 6	1,35	2,0 2	3,40
% білку в ФП	47, 13	55,83	57, 10	64,29	37, 12	41,45	60, 08	66,16	49, 71	57,07

Для порівняння отриманих результатів зазначимо, що вихід промислового ферментного препарату пероксидази складав 3,2 г/ 100 г сировини хрину з активністю 100 од/ мг (Патент РФ, 2010), що є значно вище за вихід грибних ензимів. Однак, зазначимо, що виділення останніх може бути виправдане значно меншим терміном вирощування культури-продуцента та їх унікальними властивостями.

Вивчення вмісту білку та його амінокислотного складу в ферментних препаратах каталаз (табл. 3) показав наступне. Вміст протеїну тут знаходиться в



більш широких, порівняно з ФП пероксидаз, межах від 37,1% (*F. hepatica* Fh-08) до 66,2% (*P. ostreatus* P-208).

Результати амінокислотного аналізу показують домінування у групі неполярних гідрофобних амінокислот фенілаланіну для всіх проб ФП. Виключенням тут є ФП штамів гливи звичайної, де вміст лейцину перевищує вміст фенілаланіну. Це, ймовірно, пов'язане з високим вмістом цієї амінокислоти в білках міцелію цього виду (Дудка, 1983).

З групи полярних гідрофобних амінокислот слід відмітити високий вміст треоніну та тирозину у всіх досліджених ферментних препаратах. Що також відображає вміст та співвідношення амінокислот в білках міцелію цього виду (Дудка, 1983).

Білки ФП каталаз, як і ФП пероксидаз можна було б віднести до кислих вже тільки за високим вмістом негативно заряджених аспарагінової (Асп) і глутамінової (Глу) амінокислот. Але, як вже зазначалося, при кислотному гідролізі це довести не можливо. Побічним показником переваги у структурі білків ФП каталаз кислих амінокислот може бути те, що їх 0,1%-ві водні розчини мають рівень рН, що коливається в межах від 5,3 од. (*P. ostreatus* P-01) до 6,2 од. (*F. velutipes* F-vv).

Загальний вміст основних, позитивно заряджених амінокислот в протеїні ФП не переважає інші групи цих сполук та не визначає їх природу. Лізин та аргінін тут мають найвищий масовий процент.

Як і у випадку з пероксидазами, вихід ФП каталази досліджуваних штамів-продуцентів базидіоміцетів значно нижчий за відомий *Bacillus* sp., де вихід продукту складає 1-10 г/л КФ з каталазною активністю 13500±600 ед/мл (Patent US, 2013). Однак, відмітимо, що оптимум дії останнього ФП – рН 7,0 та 25 °С, а його продуцент є умовно патогенним, що є недоліками при використанні бактеріального продуценту.

Отже, розроблені та апробовані способи отримання ферментних препаратів пероксидаз та каталаз екстра- та інтрацелюлярного походження штамів базидіальних грибів. Виділені ферментні препарати є унікальними за своїми властивостями, що обумовлює перспективи їх використання та актуальність продовження пошуку продуцентів оксидоредуктаз серед культур грибів відділу *Basidiomycota*. Крім того, в низці технологічних процесів визнано доцільним використання мультиензимних композицій, що містять ферменти як одного, так і декількох організмів-продуцентів (Синицин, 1995). Як показали наші дослідження, відібрані штами базидіоміцетів можуть бути використані і для отримання саме таких ферментних комплексів.

## ВИСНОВКИ

Таким чином, вперше розроблені способи отримання та проведено аналіз ферментних препаратів пероксидаз та каталаз екстра- та інтрацелюлярного

походження штамів базидіальних грибів *Flammulina velutipes* F-vv, *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208 та P-01. Встановлено індивідуальні характеристики – ферментативну активність ФП, масовий процент вмісту протеїну та зв'язаних амінокислот і їх співвідношення в групах залежно від природи радикалів (амфотерності) білкових молекул. Виявлено, що штам *F. velutipes* F-vv є активним продуцентом інтрацелюлярної, а штам *A. cylindracea* 167 – екстрацелюлярної пероксидази. Активними продуцентами екстрацелюлярної каталази є штами *P. ostreatus* P-01 та P-208, а інтрацелюлярної – штам *F. hepatica* Fh-08. Результати скринінгу високоактивних продуцентів оксидоредуктаз серед представників відділу *Basidiomycota*, вивчення закономірностей їх культивування та біосинтезу, розроблені способи отримання ферментних препаратів пероксидаз та каталаз екстра- та інтрацелюлярного походження дозволяють отримати нові антиоксидантні ензими, які мають широкі перспективи використання у наукових дослідженнях та різних галузях промисловості.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Moore D. Fungal products as food / D. Moore , S.W. Chiu / Fungal Diversity Press: Hong Kong. – 2001. – P. 233–251.
- Wasser S.P. Medicinal mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved problems / S.P. Wasser // Int. J. Med. Mush., 2010. – 12 (1). – P. 1-16.
- 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.
- Jordan K. Zjawiony. Biologically Active Compounds from *Aphyllophorales* (Polypore) Fungi // Journal of Natural Products. – 2004. – Vol. 67. – P. 300-310.
- 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.
- Рогожин В.В. Физиолого-биохимические механизмы прорастания зерновок пшеницы / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 8 (82). – С. 17–21.
- Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы / О.С. Мирошниченко // Биополимеры и клетка. – 1992. – Т. 8, №6. – С. 3–25.
- Волошко Т.Є. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – Одеса: ОНУ ім. І.І. Мечнікова, 2011. – №. 4(16). – С. 69-81.
- Федулов А.Л. Выделение пероксидазы из оболочек семени сои / А.Л. Федулов, Е.В. Спиридович, Е.М. Рахманько // Труды БГУ. – 2006. – Т.1. – С. 212–220.



Ngo T.T. Peroxidase in chemical and biochemical analysis / T.T. Ngo/ Analytical letters. – 2010. – Vol. 43, №10. – P.1572–1587.

Федотов О.В. Зв'язані амінокислоти і білок ферментних препаратів молокозсідальної дії у афілофорових грибів / О.В. Федотов, М.І. Бойко, С.Ф. Негруцький // Укр. ботан. журн. – 2002, – Т.59, № 1. – С. 45–48.

Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького університету, Сер. А: Природничі науки, вип. 1. – Донецьк: ДонНУ, 2012. – С. 209–213.

Волошко Т.Є. Вплив джерел азотного живлення на активність оксидоредуктаз деяких штамів базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Актуальні проблеми ботаніки та екології / Матер. міжнародної конф. молодих учених (Ужгород 19-23 вересня 2012) – Ужгород, 2012. – С.197–198.

Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот. – М: Мир, 1991. – 544 с.

Приседський Ю.Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. – Донецьк: ДонНУ, 2005. – 75 с.

Патент 2388819 Российской Федерации. Способ получения пероксидазы хрена / Суровцев В.И., Борзенков В.М., Дегушев К.В. Заявка № 2008125459/13, от 25.06.2008, кл. С12N9/08, Бюл. № 2, от 10.05.2010.

Дудка И.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Дудка И.А., Бисько Н. А., Бухало А. С., Вассер С. П. и др. – К.: Наук. думка, 1983. – 312 с.

Patent US 20130065292. Method for Increasing microbial catalase production / Chen J., Du G., Li J., Liu L., Feng Z. Application № 13/228,572, 09.09.2011, С12N9/08, С12N1/20, 14.03.2013.

Синицын А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М.: МГУ, 1995. – 224 с.

## REFERENCES

Moore, D. S., Chiu, S.W. (2001). *Fungal products as food*. Fungal Diversity Press:

Hong Kong.

Wasser, S.P. (2010). *Medicinal mushroom Science: History, Current Status, Future*

- 
- Trends, and Unsolved problems. Int. J. Med. Mush.* 12 (1), 1-16.
- Solomko, E.F., Lomberg, M.L. (2000). *Prospects for the use of therapeutic and prophylactic properties of cultivated mushrooms in the 21st century. Proceed. Int. Conf. New Technologies for Medical Problems. Kiev.*
- Jordan, K. Zjawiony. (2004). *Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi. Journal of Natural Products.* 67, 300-310.
- Fedotov, O.V. (2007). *Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes. Tbilisi: Myza.*
- Rogozhin, V. V., Rogozhina, T.V. (2011). *Physiological and biochemical mechanisms of germination of wheat grains. Bulletin of Altay State Agarian Universit* 8 (82), 17-21.
- Miroshnichenko, O.S. (1992). *Biogenesis and properties of the physiological role of catalase. Cell and biopolymers.* 8 (6), 3-25.
- Voloshko, T.E., Fedotov, O.V. (2011). *Screening of strains of basidiomycetes for antioxidant activity oxidoreductases. Microbiology and Biotechnology.* 4 (16), 69-81.
- Fedoulov, A.L., Spiridovich, Ye.V., & Rakhmanko, Ye.M. (2006). *Isolation of peroxidase from the shells of soybean seeds. Bulletin of Belgorod National Unviersity.* 1, 212-220.
- Ngo, T.T. (2010). *Peroxidase in chemical and biochemical analysis. Analytical letters.* 43 (10), 1572-1587.
- Fedotov, O.V., Boyko, M.I., Negrutskiy, S.F. (2002). *Related amino acids and protein*



- enzymes of milk subsidence action in aphylophorales fungi*. Ukrainian Botanical Journal. 59 (1), 45-48.
- Fedotov, O.V., Chayka, O.V., Voloshko, T.Ye., & Veligodska, A.K. (2012). *Collection of the culture of mushrooms are the basis of mycological research and conservation strategies basidiomycetes*. Bulletin of Donetsk University. Biological Sciences. 1, 209-213.
- Voloshko, T.E., Fedotov, O.V. (2012). *Effect of sources of nitrogen nutrition on the activity of oxidoreductases of some strains of basidiomycetes*. Proceed. Int. Conf. Actual Issues on Botany and Ecology. Uzhhorod.
- Dawson, R. (1991). *Reference of biochemist*. Moscow: Mir.
- Prisedsky, J.G. (2005). *The software package for statistical analysis of the results of biological experiments*. Donetsk: Donetsk National University.
- Surovtsev, V.I., Borzenkovm V.M., & Degushev, K.V. (2010). Patent 2388819 Russian Federation. A method for producing horseradish peroxidase.
- Dudka, I.A., Bisko, N.A., Bukhalo, A.F., & Wasser, S.P. (1983). *Higher edible Basidiomycetes in surface and deep culture*. Kiev Naukova Dumka.
- Chen, J., Du G., Li, J., Liu, L., Feng, Z. (2013). Patent US 20130065292. Method for Increasing microbial catalase production.
- Sinitsin, A.P. (1995). *Bioconversion of the lignocellulose materials*. Moscow: Moscow University Press.

*Поступила в редакцію 19.01.2013*

**Как цитировать:**

О.В. Федотов, О.В., Волошко, Т.Є. (2013). Розробка способів отримання і аналіз ферментних препаратів пероксидаз та каталаз деяких видів базидіоміцетів. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 1 (7), 113-127. **crossref**  
[http://dx.doi.org/10.7905/bbmspu.v0i1\(7\).564](http://dx.doi.org/10.7905/bbmspu.v0i1(7).564)

**© Федотов, Волошко , 2013**

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).