



О.В. Чайка, О.В. Федотов

**ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ
КСИЛОТРОФНИХ БАЗИДИОМІЦЕТІВ У ГЛИБИННІЙ КУЛЬТУРІ**

Донецький національний університет

e-mail: bio.graff@yandex.ua

Метою дослідження було встановлення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) культур ксилотрофних базидіоміцетів при глибинному культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі. Матеріал дослідження – глибинний міцелій та культуральний фільтрат 79 штамів 18 видів ксилотрофів. Серед досліджених штамів, 60 належать до порядку *Agaricales* і 19 – до порядку *Polyporales*. Більшу частину штамів (85%) було інтродуковано з дикоростучих базидіом, зібраних в різних місцевостях м. Донецька й області. Визначали абсолютно суху біомасу та розраховували її приріст і питому швидкість росту. Інтенсивність процесів ліпідної пероксидації визначали модифікованим методом за вмістом продуктів, активних до тіобарбітурової кислоти. В результаті проведених досліджень встановлено, що серед досліджених штамів, найвищий рівень процесів ПОЛ у міцелії характерний для культур *F. velutipes*, зокрема F-vv, F-03 та F-1; а незначний – у штамів *F. fomentarius* Ff-09 та Ff-1201 та штамів *L. edodes* Le-2, Le-4, Le-6, Le-7. Високий вміст продуктів ПОЛ в КФ характерний для більшості культур порядку *Polyporales*, наприклад, штамів *I. lacteus* IL-1201, *T. hirsuta* Th-11, *D. quercina* Dq-08 та *F. fomentarius* T-10. Найменше накопичують продукти ПОЛ в КФ деякі штами *F. velutipes*, наприклад, F-204, F-11, штам *S. commune* Sc-1102 та культури *G. lucidum*. Прямої залежності між вмістом продуктів ПОЛ в міцелії та КФ не встановлено. Розраховані коефіцієнти кореляції для досліджених штамів показали наявність залежності ростових показників та інтенсивності ПОЛ в міцелії і культуральній рідині. Відібрані штами з високими показниками росту та рівня ПОЛ в культуральній рідині – перспективні у технологіях біодеградації лігноцелюлозних відходів і ксенобіотиків та біоремедіації довкілля.

Ключові слова: ксилотрофні базидіоміцети, глибинне культивування, перекисне окиснення ліпідів

Чайка А.В., Федотов О.В.

**ІНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ
КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЕ**

Донецкий национальный университет

e-mail: bio.graff@yandex.ua

Целью исследования было определение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) культур ксилотрофных базидиомицетов при глубинном культивировании на глюкозо-пептонной среде. Материал исследования – глубинный мицелий и культуральный фильтрат 79 штаммов 18 видов ксилотрофов. Среди

исследованных штаммов, 60 относятся к порядку *Agaricales* и 19 – к порядку *Polyporales*. Большая часть штаммов (85%) была интродуцирована из дикорастущих базидиом, собранных в различных районах г. Донецка и области. Использовали следующие методы. Определяли абсолютно сухую биомассу, рассчитывали прирост биомассы и удельную скорость роста. Водородный показатель культурального фильтрата определяли потенциометрическим методом. Интенсивность процессов липидной перекисидации определяли модифицированным методом по содержанию продуктов, активных к тиобарбитуровой кислоте. В результате проведенных исследований установлено, что среди исследованных штаммов, наиболее высокий уровень процессов ПОЛ в мицелии характерен для культур *F. velutipes*, в частности F-vv, F-03 и F-1; а низкий – для штаммов *F. fomentarius* Ff-09, Ff-1201 и штаммов *L. edodes* Le-2, Le-4, Le-6, Le-7. Высокое содержание продуктов ПОЛ в культуральном фильтрате характерно для большинства культур порядка *Polyporales*, например, штаммов *I. lacteus* IL-1201, *T. hirsuta* Th-11, *D. quercina* Dq-08 и *F. fomentarius* T-10. Меньше всех накапливают продукты ПОЛ в культуральном фильтрате некоторые штаммы *F. velutipes*, например, F-204, F-11, штамм *S. commune* Sc-1102 и культуры *G. lucidum*. Прямой зависимости между содержанием продуктов ПОЛ в мицелии и культуральном фильтрате не установлено. Рассчитанные коэффициенты корреляции для исследованных штаммов показали наличие зависимости ростовых показателей и интенсивности ПОЛ в мицелии и культуральной жидкости. Отобранные штаммы с высокими показателями роста и уровня ПОЛ в культуральной жидкости – перспективны в технологиях биodeградации липноцеллюлозных отходов, ксенобиотиков и биоремедиации окружающей среды.

Ключевые слова: ксилотрофные базидиомицеты, глубинное культивирование, перекисное окисление липидов

Chaika A.V., Fedotov O.V.

THE LIPID PEROXIDATION PROCESSES INTENSITY OF XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES IN SUBMERGED CULTURE

Donetsk National University

e-mail: bio.graff@yandex.ua

The aim of the study was to determine the lipid peroxidation (LP) intensity of xylotrophic basidiomycetes cultures under submerged fermentation on glucose-peptone medium. The materials were submerged mycelium and culture filtrate of 79 strains of 18 species xylotrophic basidiomycetes. Among the studied strains, 60 strains belong to the order *Agaricales* and 19 – to order *Polyporales*. Most of the strains (85%) were isolated from the fruiting bodies collected in different localities of Donetsk city and its region. The following methods were used. Oven-dry biomass was determined by gravimetric method and biomass increase and specific growth rate were calculated. The pH of the culture filtrate was determined by potentiometric method. The intensity of lipid peroxidation processes was estimated with the modified thiobarbituric acid test. The study concluded that among the studied strains high level of LP in the mycelium is typical for the *F. velutipes* cultures, particularly the F-vv, F-03 and F-1. The low intensity of LP in the mycelium was established for the *F. fomentarius* Ff-09, Ff-1201 strains and the *L. edodes* Le-2, Le-4, Le-6, Le-7 strains. The



high content of LP products in the culture filtrate is typical in most *Polyporales* cultures, for example, in the strains of *I. lacteus* IL-1201, *T. hirsuta* Th-11, *D. quercina* Dq-08 and *F. fomentarius* T-10. Paucity of the LP products in the culture filtrate established for some strains of *F. velutipes*, for example, F-204, F-11, *S. commune* Sc-1102 strain and *G. lucidum* cultures. Direct dependence between the content of LP products in the mycelium and culture filtrate was not established. Calculated correlation coefficients for the investigated strains showed the dependence of the growth rates and the intensity of LP in the mycelium and culture filtrate. Selected strains with high growth rate and a significant LP level in the culture filtrate are promising in technologies of lignocellulosic wastes and xenobiotics biodegradation and environment bioremediation.

Key words: xylotrophic basidiomycetes, submerged fermentation, lipid peroxidation

Сучасні біотехнології на основі ксилотрофних базидіоміцетів можуть знайти широке застосування в харчовій промисловості і медицині для отримання численних біологічно активних речовин, що мають профілактичне, лікарське та діагностичне значення (Wasser, 2011; Бухало, 2001; Rouhana-Toubi; 2009; Chang, 2001). Розроблені методи деструкції лігноцелюлозних відходів і ксенобіотиків, біоремедіації забруднених середовищ за участю базидіоміцетів, що відкриває новий напрям їх застосування (Villas-Boas, 2002; Wesenberg, 2003; Valentin, 2006, Bezalel, 1996).

Використання базидіоміцетів у біотехнології вирішує такі завдання, як економічність (короткостроковість, замкненість, дешевизна відтворюваної сировини) та екологічність виробництва (Rouhana-Toubi; 2009; Chang, 2001; Феофилова, 2007). Причому найкраще всі ці можливості базидіоміцетів розкриваються саме при технології глибинного культивування. Подальший розвиток існуючих та створення нових біотехнологічних процесів потребує глибокого вивчення культурально-морфологічних і фізіологічних властивостей грибних культур-продуцентів.

Дереворуйнівні базидіоміцети мають унікальну здатність до розщеплення лігноцелюлозного комплексу деревини, а отже виконують головну роль в крутообігу речовин і потоці енергії в лісових екосистемах. Враховуючи значну хімічну стійкість лігніну, очевидно, що гриби білої гнилі мають використовувати надзвичайно потужні механізми його деградації. Встановлено, що процес руйнування лігніну відбувається під впливом лігнінолітичних оксидоредуктаз та залежить від генерації активних форм кисню (АФК). Останні, в силу своєї хімічної нестабільності, здатні до ініціювання спонтанних ланцюгових реакцій (Wasser, 2011; Капич 2007, 2011; Pozdnyakova, 2010; Hammel, 2002). Ці реакції носять неспецифічний характер, тому існує можливість залучення ксилотрофних базидіоміцетів до технологій розкладання лігноцелюлозних відходів промисловості та сільського господарства, а також

біоремедіації забруднених середовищ (Wesenberg, 2003; Valentin, 2006; Bezalel, 1996; Pozdnyakova, 2010; Winqvist, 2008).

З іншого боку, АФК мають здатність до ініціювання перекисного окиснення найважливіших макромолекул клітин – ліпідів, білків, нуклеїнових кислот. Це призводить до порушення метаболічних процесів, дезорганізації функціонування, патології та загибелі клітин (Pham-Huy, 2008; Droge, 2002; Владимиров, 2000). Ця проблема є особливо актуальною для дереворуйнівних грибів через те, що вони, здійснюючи окислювальну деградацію лігніну, постійно зазнають впливу перекисних радикалів. Для забезпечення нормальної життєдіяльності, у них розвилася складна і ефективна система підтримання про-антиоксидантної рівноваги. Тому, надзвичайно важливою є оцінка інтенсивності протікання процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) культур базидіоміцетів, залучених до різноманітних біотехнологічних процесів.

Метою роботи було визначення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів культур ксилотрофних базидіоміцетів при глибинному культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом дослідження були глибинний міцелій та культуральний фільтрат 79 штамів 18 видів ксилотрофів з колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету (Федотов, 2012). Серед досліджених штамів, 60 належать до порядку *Agaricales*: *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer – 167, 218, 960, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – Le-2, Le-340, Le-4, Le-6, Le-7, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer – F-03, F-06, F-073, F-1, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-610, F-vv, F-10, F-11, F-1105, *Fistulina hepatica* (Schaeff.) With. – Fh-08, Fh-09, Fh-18, *Schizophyllum commune* Fr. – Sc-10 Sc-1102 Sc-1104, *Pleurotus citrinopileatus* Singer – P-citr, *Pleurotus eryngii* (DC.) Qué. – P-er, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) 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-91, P-94, P-105, P-107, P-191, P-203, P-206, P-208, P-209, P-210, P-998, P-6v, P-4к, P-12к, P-ка, HУ-35, а 19 – до порядку *Polyporales*: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. – Gl-1, Gl-2, Gl-3, Gl-B-99, Gl-11, *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. – IL-4K, IL-1, IL-1201, *Fomes fomentarius* (L.) Fr. – Ff-09, T-10, Ff-1201, *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát – Th-11, *Trametes ochracea* (Pers.) Gilb. & Ryvarden – To, *Trametes trogii* Berk. – Tt-11, *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarden – Tb-11, *Daedalea quercina* (L.) Pers. – Dq-08, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray – Gf-01, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill – Ls-08, Ls-09. Більшу частину штамів (85%) було виділено в чисту культуру методом вилучення тканинних ізолятів (Бухало, 1988) з дикоростучих базидіом, зібраних в різних місцевостях м. Донецька й області. Крім того, для досліджень отримано 5 штамів з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК): 167, 218, 960, Le-340, F-610 та 7 штамів – з комерційних організацій «УкрМіцелій» та «Біотехнологія»: Le-2, Le-4, Le-6, Le-7, P-citr, P-er, Hk-35. Чисті міцеліальні культури

ISSN 2225-5486 (Print), ISSN 2226-9010 (Online). Біологічний вісник МДПУ. 2013. №2



підтримуються на агаризованому незахміленому пивному суслі (4° за Баллінгом) при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$ шляхом пересівів кожні 5-6 місяців.

З метою вивчення інтенсивності ПОЛ, штами культивували глибинним методом на глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) наступного складу (г/л): пептон (Biofac, Данія) – 3,0; глюкоза – 10,0; 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 (всі компоненти – кваліфікаційного та хч). Співвідношення С:N у ГПС дорівнювало 13:1. Початковий рН ГПС складав $6,62\pm 0,06$. Культивування проводили при $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ – температурному оптимумі росту більшості штамів (Дудка, 1982). Процес глибинного культивування штамів ксилотрофних базидіоміцетів, проводили в колбах ємністю 250 мл з 50 мл ГПС на лабораторній качалці АВУ-6С (Росія) зі зворотно-поступальним рухом з режимом 45 хв. роботи з частотою 120 коливань за хв. та 15 хв. – інтервал. Інокулюмом слугував гомогенізований глибинний міцелій, що вирощувався в аналогічних умовах в колбах з шипоподібними відбійниками протягом 7 діб. Перед пересівом визначали абсолютно суху біомасу, а також відсутність контамінації інокулюму за допомогою світлового мікроскопу XS-5520 MICROmed (Китай). Інокілюм вносили в кількості 10% за об'ємом.

Для досліджень використовували міцелій та культуральний фільтрат. Наприкінці терміну ферментації міцелій відділяли від культуральної рідини за допомогою щільної капронової тканини, отримуючи таким чином культуральний фільтрат (КФ). Водневий показник КФ визначали потенціометричним методом на рН-метрі „рН-150 МИ” (Росія). Міцелій тричі промивали дистильованою водою, підсушували фільтрувальним папером. Визначали сиру і абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію ваговим методом (Дудка, 1982). За отриманими даними розраховували приріст біомаси та питому швидкість росту культур базидіоміцетів μ (доба⁻¹) за формулою (Дудчик, 2009):

$$\mu = \frac{(\ln m_1 - \ln m_0)}{t_1 - t_0},$$

де m_0 та m_1 – початкова та кінцева концентрація абсолютно сухої маси (г) в початковий (t_0) та кінцевий момент часу (t_1), відповідно.

Інтенсивність процесів ліпідної пероксидації визначали модифікованим методом за вмістом продуктів ПОЛ, активних до тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) (Стальная, 1977). Принцип методу полягає в тому, що при нагріванні в кислому середовищі частина продуктів ПОЛ, що належить до класу гідроперекисів, розкладається з утворенням малонового діальдегіду (МДА), взаємодія якого з ТБК веде до утворення забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм. Наважку охолодженого підготовленого міцелію (0,5 г) переносили у фарфорову ступку та гомогенізували шляхом розтирання. Всі операції з гомогенізації проводили

при температурі не вище +5°C. В ступку додавали 2,0 мл 22,5% розчину трихлороцтової кислоти (Merck, Німеччина), і знов гомогенізували. Потім додавали 2,0 мл 0,6% розчину 2-тіобарбітурової кислоти (Merck, Німеччина), ще раз гомогенізували, вміст ретельно перемішували, переносили в пробірку та кип'ятили протягом 15 хвилин на водяній бані. Після інкубації проби швидко охолоджували і центрифугували 15 хвилин при 3000 об/хв. Відбирали супернатант в сухі чисті пробірки (дослідна проба). В контрольній пробі замість гомогенату використовували 0,5 мл дистильованої води; в пробі з культуральним фільтратом – 0,5 мл КФ. Подальша обробка контрольної проби та проби з КФ проходила так само, як і дослідної з міцелієм, центрифугування зазвичай не потрібне. Екстинкції дослідної проби вимірювали проти контрольної на спектрофотометрі СФ-26 при довжинах хвиль 532 нм і 590 нм. Розрахунок вмісту ТБК-АП (А) вели за формулою:

$$A = \frac{(E_{532} - E_{590}) \cdot 10^6 \cdot V \cdot K}{1,56 \cdot 10^5 \cdot P},$$

де: E_{532} і E_{590} – показники екстинкції дослідної проби при 532 і 590 нм; 10^6 – фактор розмірностей; V – об'єм реакційної суміші (мл); K – коефіцієнт перерахунку на абсолютно суху масу міцелію (для КФ – не враховується); $1,56 \cdot 10^5$ – молярний коефіцієнт екстинкції; P – кількість матеріалу – сирого міцелію (г) чи КФ (мл). Вміст ТБК-АП виражали в нмоль/г (мл).

Досліди проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані обробляли з використанням Microsoft Excel та пакету програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів (Приседський, 1999).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Шляхом апробації різних режимів, розроблено процес глибинного культивування штамів ксилотрофів, який описано в попередньому розділі. Термін культивування більшості штамів становив 6 діб, а для трьох штамів (*G. frondosa* Gf-01, *L. sulphureus* Ls-08 та Ls-09) його було подвоєно через повільну швидкість росту міцелію.

Наприкінці терміну глибинного культивування були отримані показники приросту біомаси досліджуваними штамми, які більш детально охарактеризовані в попередніх публікаціях.

Однак, вважаємо за доцільне вказати найбільш значимі ростові дані досліджених культур базидіоміцетів. Найбільший приріст біомаси серед 8 видів порядку *Agaricales* встановлений для *S. commune* з середньовидовим значенням 4,31; *F. hepatica* – 3,94; *P. eryngii* – 3,88 та *A. aegerita* – 3,67 г/л. Найнижчі значення приросту біомаси зафіксовані для видів *L. edodes* – середнє значення 0,83 та *P. citrinopileatus* – 1,36 г/л. Приріст біомаси 28 штамів виду *P. ostreatus* коливався в широких межах: від 1,31 до 5,85 г/л з середнім значенням 2,62 г/л.

Приріст біомаси 16 культур *F. velutipes* мав середнє значення 2,53 г/л з коливанням показника від 0,97 до 3,96 г/л.

Серед 10 видів порядку *Polyporales* найбільші значення приросту біомаси зафіксовані у *T. trogii* – 3,57, *D. quercina* – 3,38 та *T. hirsuta* – 3,17 г/л. Найнижчі ж значення приросту біомаси характерні для видів *L. sulphureus* – 0,07 та *G. frondosa* – 0,23 г/л.

Найвище значення питомої швидкості росту серед видів порядку *Agaricales* встановлено у *S. commune* з середнім рівнем 0,48 доба⁻¹. Для *P. ostreatus* це значення становило 0,45 доба⁻¹, що співпадає з таким для *F. velutipes* – 0,44 доба⁻¹. Найнижча питома швидкість росту серед видів цього порядку була встановлена для *L. edodes* з середньовидовим значенням 0,27 доба⁻¹.

Види порядку *Polyporales* з найвищими середньовидовими показниками питомої швидкості росту розташовуються у порядку убавання: *T. biforme* – 0,56, *T. hirsuta* – 0,48 та *I. lacteus* 0,44 доба⁻¹. Найнижчі ж ці показники характерні для видів *L. sulphureus* – 0,05 та *G. frondosa* – 0,18 доба⁻¹.

Рівень рН культурального фільтрату є одним з найважливіших показників, що водночас і характеризує, і визначає метаболізм культури (Бухало, 1988; Есрейо, 1991). На рис. 1. представлені значення рН культуральної рідини досліджуваних штамів на 6-ту добу ферментації у порівнянні з вихідним показником рН стерилізованого ГПС.

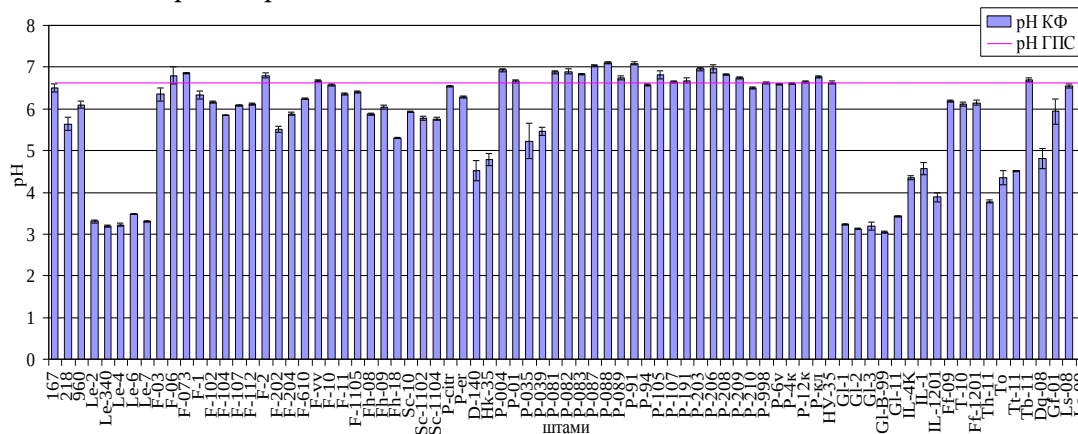


Рис. 1. Водневий показник культурального фільтрату штамів базидіальних грибів.

Fig. 1. Hydrogen index of basidiomycetes strains culture filtrate.

Наприкінці терміну культивування для більшості – 47 штамів – характерне вірогідне зниження водневого показника культуральної рідини порівняно з вихідним ГПС у 6,62 од. Найнижчі значення рН КФ для видів порядку *Agaricales* зареєстровано у *L. edodes* з середньовидовим значенням 3,30 од. Серед

представників *Polyporales* найбільше закислення середовища зафіксоване для видів *G. lucidum* з середнім значенням рН у 3,20 од. та *T. hirsuta* – 3,78 од.

Вірогідно не змінюють вихідне рН 16 досліджених штамів. Водневий показник культурального середовища штамів *L. sulphureus* навіть після подвоєного часу ферментації був близьким до початкового, що разом з низькими ростовими показниками може свідчити про низьку інтенсивність метаболізму цієї культури в даних умовах ферментації.

Для 16 досліджених штамів характерне вірогідне підвищення рівня рН КФ в ході 6-ти добового росту на ГПС. Так, водневий показник КФ штаму *P. ostreatus* P-088 мав значення 7,11. Високі показники встановлено також у штамів *P. ostreatus*: P-94 – 7,09 та P-087 – 7,03 од. Середньовидове значення рН КФ для *P. ostreatus* дорівнювало 6,53 од. Деякі штами *F. velutipes* незначно підвищують рН КФ, зокрема F-073 – до 6,86 од., а F-2 та F-06 – до 6,80 од. Середньовидове значення рН КФ штамів *F. velutipes* становило 6,31 од.

Ми припускаємо, що зареєстрована зміна початкового рівня рН культуральної рідини в ході росту досліджених штамів є наслідком ростових процесів глибинного міцелію на ГПС: засвоєння культурою компонентів середовища і вивільнення та виділення продуктів обміну, зокрема органічних кислот. Разом з тим відомо, що базидіоміцети мають здатність і до спрямованого регулювання рН субстрату для забезпечення оптимального засвоєння поживних речовин та росту (Бухало, 1988; Espejo, 1991).

Наступним етапом дослідження було визначення вмісту ТБК-АП в водній витяжці міцеліального гомогенату. Отримані дані представлені на рис. 2.

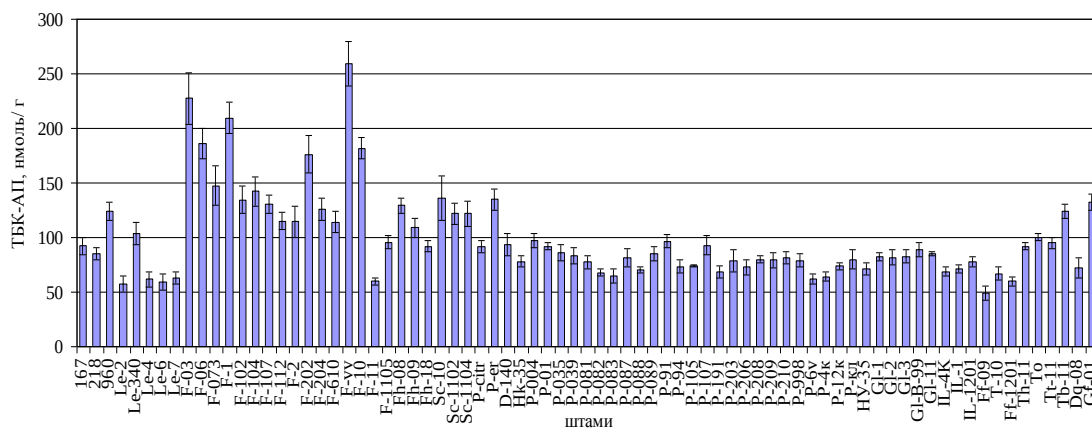


Рис. 2. Вміст ТБК-АП в міцелії штамів базидіальних грибів.

Fig. 2. The content of TBARS in basidiomycetes strains mycelium.

Виходячи з отриманих даних, переважна більшість досліджених штамів – 68% – мають вміст ТБК-АП в міцелії в межах від 70 до 110 нмоль/г АСБ. В цьому діапазоні знаходиться інтенсивність ПОЛ видів *A. aegerita*, *F. hepatica*,



P. citrinopileatus, *P. ostreatus* з порядку *Agaricales* та *G. lucidum*, *I. lacteus*, *D. quercina*, а також роду *Trametes* з порядку *Polyporales*.

Вищою за цей інтервал є інтенсивність процесів ПОЛ у більшості штамів *F. velutipes*. Середньовидовий вміст ТБК-АП тут становить 151,33 нмоль/ г, а максимальний – для штаму F-vv – 259,19 нмоль/ г. Також високий рівень ПОЛ в міцелії мають штами *S. commune* з середнім вмістом ТБК-АП у 126,68 нмоль/ г і максимальним – у штаму Sc-10 – 136,21 нмоль/ г. Далі за порядком убутання вмісту продуктів ПОЛ ідуть штами *P. eryngii* P-er, *G. frondosa* Gf-01 та *T. biforme* Tb-11.

Нижчою за середній рівень, інтенсивність процесів ПОЛ була у штамів *L. edodes* з середнім вмістом ТБК-АП – 68,96 нмоль/ г і мінімальним у штаму Le-2 – 57,51 нмоль/ г. Для деяких штамів *F. velutipes*, також зареєстрована низька концентрація продуктів ПОЛ, зокрема у штаму F-11 вона складала 59,81 нмоль/ г. Незначний середньовидовий вміст ТБК-АП у 58,65 нмоль/ г відмічено для міцелію культур *F. fomentarius*, з яких найнижчий – 49,03 нмоль/ г – у міцелії штаму Ff-09.

Визначали коефіцієнт кореляції (r) між питомою швидкістю росту та інтенсивністю процесів ПОЛ в міцелії досліджених штамів найбільш численних видів. Встановлено, що існує зв'язок – від'ємна кореляція між цими показниками штамів *F. velutipes*, $r = -0,63 \pm 0,14$. Кореляція ж цих показників штамів *P. ostreatus* характеризується більш низьким значенням $r = -0,38 \pm 0,16$. Ці показники кореляції вказують на те, що вища питома швидкість росту характерна культурам з низькою інтенсивністю процесів ПОЛ в міцелії. Тобто низький вміст ТБК-АП в міцелії може свідчити про сприятливі фізичні та хімічні умови ферментації. Різний рівень активності процесів ПОЛ в міцелії обумовлений, також, наявністю певної кількості антиоксидантів, які пригнічують вільнорадикальні реакції, на що також вказують результати дослідження (Капич, 2007). Для інших штамів коефіцієнт кореляції не розраховувався через незначні їх вибірки.

На рис. 2. не наведені показники вмісту ТБК-АП в міцелії штамів *L. sulphureus* через дуже низький рівень накопичення біомаси, а отже було неможливо одержати необхідну кількість матеріалу для дослідів. Результати тут можуть бути завищені і через негативний вплив високого вмісту в міцелії забарвлених речовин – пігментів, зокрема каротиноїдів.

Як відомо, для біотехнологічного використання культур грибів, цікавим є здатність їх до накопичення продуктів метаболізму у культуральній рідині, що може значно спростити та здешевити технологію. З іншого боку, вміст про- і антиоксидантів у КФ, які є комерційно вигідними, напряду залежить від стану про-антиоксидантної системи та рівня вмісту продуктів ПОЛ. На рис. 3 представлені значення концентрацій продуктів ПОЛ в культуральному

фільтраті штамів у порівнянні з їх вмістом у вихідному живильному середовищі.

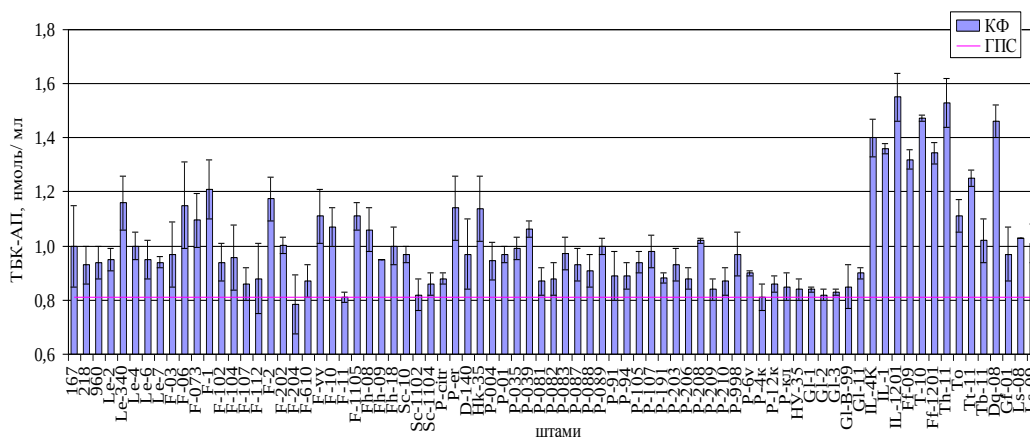


Рис. 3. Вміст ТБК-АП в КФ штамів базидіальних грибів.

Fig. 3. The content of TBARS in basidiomycetes strains culture filtrate.

Результати цього дослідження показали загальну тенденцію до більш високого нативного вмісту продуктів ПОЛ в міцеліальних клітинах, порівняно з цим показником у культуральній рідині на кінець терміну культивування. Аналіз результатів дослідження, також, показав відсутність кореляції між вмістом продуктів ПОЛ в міцелії та КФ.

Встановлено, що найбільше накопичення продуктів ПОЛ в КФ досліджуваних штамів характерне для штамів родин *Phanerochaetaceae*, *Polyporaceae* та *Fomitopsidaceae* порядку *Polyporales*. Так, середньовидовий вміст ТБК-АП *I. lacteus* складає 1,44 нмоль/ мл, максимальний – у свіжовиділеного штаму IL-1201 – 1,55 нмоль/ мл. Для *F. fomentarius* ці показники становлять: середнє – 1,38 нмоль/ мл, максимальне – у штаму T-10 – 1,47 нмоль/ мл. КФ штаму *T. hirsuta* Th-11 містить ТБК-АП в кількості 1,53 нмоль/ мл, штаму *T. trogii* Tt-11 – 1,25 нмоль/ мл, а штаму *D. quercina* Dq-08 – 1,46 нмоль/ мл. Встановлено пряму кореляцію між питомою швидкістю росту та вмістом ТБК-АП в КФ штамів порядку *Polyporales*, $r = 0,62 \pm 0,15$.

Серед видів порядку *Agaricales* найбільші значення вмісту ТБК-АП в КФ встановлено для декількох штамів *F. velutipes*, з яких максимальне – у штаму F-1, що становить 1,21 нмоль/ мл. Значний рівень продуктів ПОЛ відмічено і в культуральному фільтраті штаму *P. ostreatus* Hk-35, який дорівнює 1,14 нмоль/ мл. На цьому ж рівні знаходяться показники вмісту ТБК-АП в КФ штамів *P. eryngii* P-er та *L. edodes* L.e.-340. Найменшу кількість продуктів ПОЛ в КФ зафіксовано у деяких штамів *F. velutipes*, наприклад, у штаму F-204 – 0,79 нмоль/ мл, штаму *S. commune* Sc-1102 – 0,82 нмоль/ мл, та всіх штамів *G. lucidum* з середньовидовим показником 0,85 нмоль/ мл. Для штамів *P. ostreatus*



встановлено позитивну ($r = 0,70 \pm 0,09$), а для *F. velutipes* – негативну кореляцію ($r = -0,73 \pm 0,12$) між приростом біомаси та вмістом ТБК-АП в КФ.

Високий вміст продуктів ПОЛ в КФ деяких видів базидіоміцетів може бути наслідком активної неспецифічної реакції, спрямованої на розщеплення і засвоєння органічних речовин живильного середовища. Це, скоріш за все, є характерним для штамів виду *P. ostreatus* та ксилотрофів порядку *Polyporales*, що підтверджується отриманими результатами. В цьому випадку у штамів з високим рівнем продуктів ПОЛ в КФ спостерігається активний ріст, а інтенсивність ПОЛ в міцелії залишається на відносно невисокому рівні. В іншому випадку, при невідповідності умов ферментації потребам культури, на фоні активізації процесів ПОЛ в міцелії і в КФ відмічається низький рівень ростових показників. Це підтверджують отримані результати для низки штамів *F. velutipes* з високим вмістом продуктів ПОЛ в міцелії та низькими показниками росту.

ВИСНОВКИ

Таким чином, порівняльне дослідження 79 штамів 18 видів ксилотрофних базидіоміцетів при глибинному культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі дозволило встановити їх індивідуальні показники інтенсивності процесів ПОЛ в міцелії та культуральному фільтраті. Серед досліджених штамів, найвищий рівень процесів ПОЛ у міцелії зареєстровано для культур *F. velutipes*, зокрема F-vv, F-03 та F-1. Низьку інтенсивність ПОЛ в міцелії встановлено у штамів *F. fomentarius* Ff-09 та Ff-1201, а також у деяких штамів *L. edodes*. Високий вміст продуктів ПОЛ в КФ характерний для більшості культур порядку *Polyporales*, наприклад, штамів *I. lacteus* IL-1201, *T. hirsuta* Th-11, *D. quercina* Dq-08 та *F. fomentarius* T-10. Найменше накопичують продукти ПОЛ в КФ деякі штами *F. velutipes*, наприклад, F-204, F-11, штам *S. commune* Sc-1102 та культури *G. lucidum*. Прямої залежності між вмістом продуктів ПОЛ в міцелії та КФ не встановлено. Розраховані коефіцієнти кореляції для досліджених штамів показали наявність залежності ростових показників та інтенсивності ПОЛ в міцелії і культуральній рідині.

Різний рівень процесів ліпідної пероксидації досліджених культур обумовлений генотипічними та екзогенними факторами. Враховуючи те, що вирішальна більшість досліджуваних штамів інтродукована з карпофорів, зібраних в індустріальному регіоні, можемо стверджувати наступне. Мікоорганізми під час впливу на них факторів зовнішнього середовища чи при освоєнні нової екологічної ніші, адаптувалися, набуваючи при цьому властивостей і зміни норм реакції, що досягається за рахунок варіабельності онтогенетичних і фізіологічних властивостей. Ці адаптаційні перебудови, скоріше за все, ведуть і до формування мікобіоти урбанізованих систем, яка специфічно проявила себе в дослідженні. Відібрані штами з високими ростовими показниками та

значним рівнем ПОЛ в культуральній рідині можуть бути використані у технологіях біодеградації лігноцелюлозних відходів і ксенобіотиків та біоремедіації довкілля.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 89. – P. 1323 – 1332.

Бухало А.С. Бісько Н.А., Соломко Е.Ф. та ін. Дослідження культур їстівних та лікарських шапинкових грибів // *Мат-ли XI з'їзду Укр. ботан. тов-ва.* – Харків, 2001. – С. 55 – 56.

Rouhana-Toubi A. Wasser S.P., Fares F. Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of Higher Basidiomycetes mushrooms inhibit human ovarian cancer cell growth // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 2009. – V. 11(1). – P. 29 – 37.

Chang S.T. A 40-year journey through bioconversion of lignocellulosic wastes to mushrooms and dietary supplements // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 2001. – V. 3. – P. 299 – 310.

Villas-Boas S.G., Esposito E., Mitchell D.A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds // *Anim. Feed Sci. Technol.* – 2002. – V. 98. – P. 1 – 12.

Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents // *Biotechnol. Adv.* – 2003. – V. 22. – P. 161 – 187.

Valentin L., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi // *Int. Biodeteriorat. Biodegradat.* – 2006. – V. 58. – P. 15 – 21.

Bezalel L., Hadar Y., Fu P.P. et al. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 62. – P. 2547 – 2553.

Феофилова Е.П. Новые биотехнологии получения биологически активных веществ из мицелиальных грибов // *Успехи медицинской микологии.* – 2007. – Т. 9. – С. 195 – 196.

Капич А.Н. Сопряжение перекисного окисления липидов с деградацией лигнина у дереворазрушающих базидиомицетов // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр.* – 2011. – Т. 3. – С. 316 – 335.

Pozdnyakova N.N., Nikiforova S.V., Turkovskaya O.V. Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1 // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2010. – V. 5 (1). – P. 83 – 94.

Капич А.Н., Корнейчик Т.В. Определение антиоксидантной активности на модели перекисного окисления линолевой кислоты, инициированного грибной марганец пероксидазой // *Успехи медицинской микологии.* – 2007. – Т. 9. – С. 162 – 164.



- Hammel K.E., Kapich A.N., Jensen K.A.Jr., Ryan Z.C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2002. – V. 30. – P. 445 – 453.
- Winquist E., Moilanen U., Mettala A. et al. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi // *Biochem. Eng. J.* – 2008. – V. 42. – P. 128 – 132.
- Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huyc C. Free radicals, antioxidants in disease and health // *International Journal of Biomedical Science*. – 2008. – V. 4. – P. 89 – 96.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiological Reviews*. – 2002. – V. 82. – P. 47 – 95.
- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // *Сорос. образоват. журн.* – 2000. – № 12. – С. 13 – 19.
- 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 національного університету. Серія А природничі науки*. – Донецьк, ДонНУ, 2012. – № 1. – С. 209 – 213.
- Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.
- Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. Методы экспериментальной микологии. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
- Дудчик Н.В. Использование микробиотестирования при оценке токсичности химических веществ в окружающей среде // *Гигиена и санитария*. – 2009. – № 1. – С. 84 – 87.
- Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. – *Современные методы в биохимии*. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
- Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Кассіопея, 1999. – 210 с.
- Espejo E., Agosin E. Production and Degradation of Oxalic Acid by Brown Rot Fungi // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – V. 57 (7). – P. 1980 – 1986.

REFERENCES

- Wasser, S.P. (2011) *Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1323-1332.

- Bukhalo, A.S., Bisko, N.A, Solomko, E.F. et al. (2001) *The study of cultures edible and medicinal mushrooms*. Proceedings of the XI Congress of the Ukr. Botan. Society. Kharkiv.
- Rouhana-Toubi, A. Wasser, S.P., Fares, F. (2009) *Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of Higher Basidiomycetes mushrooms inhibit human ovarian cancer cell growth*. Int. J. Med. Mushrooms. 11 (1), 29-37.
- Chang, S.T. (2001) *A 40-year journey through bioconversion of lignocellulosic wastes to mushrooms and dietary supplements*. Int. J. Med. Mushrooms. 3, 299-310.
- Villas-Boas, S.G., Esposito, E., Mitchell, D.A. (2002) *Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds*. Anim. Feed Sci. Technol. 98, 1-12.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. (2003) *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*. Biotechnol. Adv. 22, 161-187.
- Valentin, L., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M. (2006) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi*. Int. Biodeteriorat. Biodegradat. 58, 15-21.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P. et al. (1996) *Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus**. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2547-2553.
- Feofilova, E.P. (2007) *New biotechnologies for production of biologically active compounds from filamentous fungi*. Successes Medical Mycology. 9, 195-196.



- Kapich, A.N., Korneichik, T.V. (2007) *Determination of antioxidant activity in the model of peroxidation of linoleic acid initiated by fungal manganese peroxidase. Successes Medical Mycology. 9, 162-164.*
- Kapich, A.N. (2011) *Conjugation of lipid peroxidation with degradation of lignin in wood-destroying Basidiomycetes. Microbial Biotechnology: fundamental and applied aspects: Trans. Sc. Papers. 3, 316-335.*
- Pozdnyakova, N.N., Nikiforova, S.V., Turkovskaya, O.V. (2010) *Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus Pleurotus ostreatus D1. Cent. Eur. J. Biol. 5 (1), 83-94.*
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A.Jr., Ryan, Z.C. (2002) *Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. Enzyme and Microbial Technology. 30, 445-453.*
- Winquist, E., Moilanen, U., Mettala, A. et al. (2008) *Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. Biochem. Eng. J. 42, 128-132.*
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huyc, C. (2008) *Free radicals, antioxidants in disease and health. International Journal of Biomedical Science. 4, 89-96.*
- Droge, W. (2002) *Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews. 82, 47-95.*
- Vladimirov, Y.A. (2000) *Free radicals in biological systems. Soros. Ed. Journal. 12, 13-19.*

- Fedotov, O.V., Chaika, O.V., Voloshko, T.E., Veligodska, A.K. (2012) *Culture Collection of mushrooms – the basis of mycological research and strategy for biodiversity conservation basidiomycetes*. Bulletin of Donetsk National University. Series A. 1, 209-213.
- Bukhalo, A.S. (1988) *Higher edible Basidiomycetes in pure culture*. Kiev: Naukova Dumka.
- Dudka, I.A., Wasser, S.P., Ellanskaya, I.A. (1982) *Methods of Experimental Mycology*. Kiev: Naukova Dumka.
- Dudchik, N.V. (2009) *Using microbiotesting when assessing the toxicity of chemicals in the environment*. Hygiene and sanitation. 1, 84-87.
- Stalnaya, I.D., Garishvili, T.G. (1977) *Method for the determination of malondialdehyde with thiobarbituric acid*. Modern methods in biochemistry. Moscow: Medicine.
- Prisedsky, J.G. (2005) *The software package for statistical analysis of the results of biological experiments*. – Donetsk: Donetsk National University.
- Espejo, E., Agosin, E. (1991) *Production and Degradation of Oxalic Acid by Brown Rot Fungi*. Appl. Environ. Microbiol. 57 (7), 1980-1986.



Поступила в редакцію 15.06.2013

Как цитировать:

О.В. Чайка, О.В. Федотов (2013). Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів ксилотрофних базидіоміцетів у глибинній культурі. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 2 (8), 220-236. **crossref** [http://dx.doi.org/10.7905/bbmsspu.v0i3\(6\).543](http://dx.doi.org/10.7905/bbmsspu.v0i3(6).543)

© Чайка, Федотов, 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/).