

УДК 663.1
© 2012

Дорошкевич Н. В., кандидат сільськогосподарських наук
Донецький національний університет

Шевкоплас В. М., кандидат хімічних наук
Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України

ОЦІНКА НОВИХ ІЗОЛЯТІВ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ.: FR.) *KUMMER* ЗА ДОПОМОГОЮ ІНФРАЧЕРВОНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

Рецензент – кандидат біологічних наук А. І. Сафонов

Зроблено попередню оцінку ізолятів гриба *P. ostreatus* за допомогою інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії позаклітинних білків. Встановлено, що смуги поглинання при 3350, 2920, 1410, 1300–1000, 925–850 і 690–600 cm^{-1} можуть свідчити про наявність у структурі різних функціональних груп. Дані ІЧ-спектроскопії вказують, що оптична щільність смуг поглинання (E) позаклітинних білків характеризується різною інтенсивністю, що пов'язано з фізіологічними особливостями вивчених ізолятів гриба. Показано, що в якості додаткової оцінки нових ізолятів гливи звичайної можна використовувати інтенсивність смуги поглинання при 1040 cm^{-1} , яка вказує на наявність у позаклітинних білках активних кисневих сполук, за допомогою яких гриб здійснює деструкцію вуглецю живильного субстрату. Встановлено взаємозв'язок між накопиченням біомаси грибом на рідкому живильному середовищі та інтенсивністю смуги поглинання ІЧ-спектру позаклітинних білків при 1040 cm^{-1} .

Ключові слова: ізоляти, позаклітинні білки, ІЧ-спектроскопія, смуги поглинання, функціональна група, біомаса, взаємозв'язок

Постановка проблеми. Відомо, що гриб *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer, або глива звичайна, належить до грибів білої гнилизни з досить розвиненим ферментативним апаратом, здатним засвоювати різноманітні вуглецеві субстрати [2, 6]. Необхідність його вивчення обумовлена тим, що за обсягом виробництва він займає друге місце в Україні після печериці, а промислове культивування цього гриба становить 16,3 % від загального світового виробництва [12, 18]. Доступність і легкість у роботі з грибом *P. ostreatus* дає можливість опрацювати значну кількість різноманітних нових штамів і зробити попередню оцінку щодо їх подальшого використання [5]. Це передбачає впровадження нових сучасних методів дослідження, які розширюють нашу уяву про морфобіологічні особливості гриба. Зокрема таким методом є електро-

форез, за яким можна фракціювати білки на білки з різною рухливістю [15]. Однак недоліком методу є те, що він дає можливість лише якісно охарактеризувати білки. Окремі автори пропонують використовувати інфрачервону спектроскопію (ІЧ) для вивчення білків грибів, що є підставою для отримання додаткової інформації стосовно морфологічної активності гриба [10, 17].

Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. У роботі методом ІЧ-спектроскопії було вивчено екзополісахариди родів *Cephalosporium* і *Acremonium*, які гриби синтезували за термін культивування на рідкому живильному середовищі, до складу якого входили глюкоза і дріжджовий екстракт. Встановлено, що ІЧ-спектри екзополісахаридів вивчених культур були схожими й мали полосу поглинання при 890 нм, що вказує на наявність 1-4- β -зв'язку в їх структурі [16]. Крім того, за допомогою ІЧ-спектроскопії було вивчено пігменти гриба роду *Trichoderma* [10]. Багатьма авторами [13, 14, 17] доведено, що за допомогою ІЧ-спектроскопії можна вивчити специфічні позаклітинні білки (пероксидази, оксидази та інші ферменти), які гриби продукують у рідке живильне середовище й які беруть участь у деструкції вуглецевого субстрату.

Мета досліджень – вивчення позаклітинних білків нових ізолятів гриба *P. ostreatus* із використанням методу ІЧ-спектроскопії для їх попередньої оцінки.

Матеріали та методи досліджень. Для роботи взято природні ізоляти гриба *P. ostreatus*, які було виділено з плодових тіл, зібраних із різних деревинних субстратів: К-99, Р-01, В-99, ВК-2000, С-2000. В якості контролю використано штам НК-35, який занесено до Державного реєстру сортів України і який останнім часом культивується у промисловому масштабі [4].

Для визначення фізіологічного показника гриба (здатність накопичувати біомасу) ізоляти по-

передньо вирощувалися на картопляно-сахарозному середовищі (КСС) (сахароза, 30 г/л) за поверхневого культивування в колбах Ерленмейєра ємністю 250 мл, в які наливали 50 мл живильного середовища. Стерилізацію живильних середовищ здійснювали в автоклаві АГ-1 із температурою 121 °С під тиском 1 атм протягом години. Після інокуляції колби ставили у термостат із температурою 26 °С на термін 30 діб, за який гриб (за попередніми спостереженнями) повністю використовував вуглець живильного середовища [5]. Досліди проводили в трикратній повторності. Після культивування визначали біомасу ваговим методом [8].

Ліофільне сушіння позаклітинних білків культуральної рідини (КР) нових штамів гриба *P. ostreatus* було проведено на приладі «Іній 3-2». Для цього КР обсягом 30 мл вносили в колбу ємністю 0,5 л, переносили в холодильну камеру й заморожували до температури -70 °С. Потім колби (6 шт.) із замороженою КР приєднували за допомогою гумових кранів до колектора, з якого під вакуумом (6,67 Па) постійно викачувалося повітря з парами води. Конденсат, що створювався за допомогою вакуумного насоса, попадав у камеру-пастку, де він накопичувався на випарнику з наступним видаленням. Охолодження випарника здійснювали за допомогою температурного холодильного агрегату. Після закінчення ліофільного сушіння (3–4 години), коли температура колб досягала 20 °С, їх знімали з колектора й висушені зразки білка з колб збирали в скляні пухирці (12,5 см³), закривали гумовою пробкою, після чого зберігали в холодильній камері з температурою 0 °С. Отримані ліофіляти використовували для аналізу позаклітинних білків гриба за допомогою методу ІЧ-спектроскопії.

Інфрачервону (ІЧ) спектроскопію позаклітинних білків гриба *P. ostreatus* після ліофільного сушіння проведено на приладі «Specord» UR-20 в інтервалі смуг поглинання 3800–400 см⁻¹ [3]. Співвіднесення смуг поглинання ІЧ-спектра було проведено за даними І. Кесслера і А. Сміта [15, 16]. Точність виміру становила ± 5 см⁻¹. Для кількісної оцінки змін позаклітинних білків штамів гриба *P. ostreatus*, підраховували оптичну щільність (E) смуг поглинання ІЧ-спектра білків за наступною формулою: $E = \log I_0/I$, де: I_0 – інтенсивність падаючого випромінювання, мм; I – інтенсивність прохідного випромінювання, мм [7, 11].

Оцінку статистичної вірогідності отриманих даних проводили за допомогою дисперсійного аналізу та множинного порівняння середніх за

методом Данета [1, 9]. Для встановлення взаємозв'язків використовували комп'ютерну програму Origin 7.

Результати досліджень. Для характеристики позаклітинних білків проведено ІЧ-спектроскопію ліофілятів всіх штамів гриба *P. ostreatus*. На рис. 1 у якості прикладу наведено ІЧ-спектр позаклітинних білків контрольного штаму НК-35.

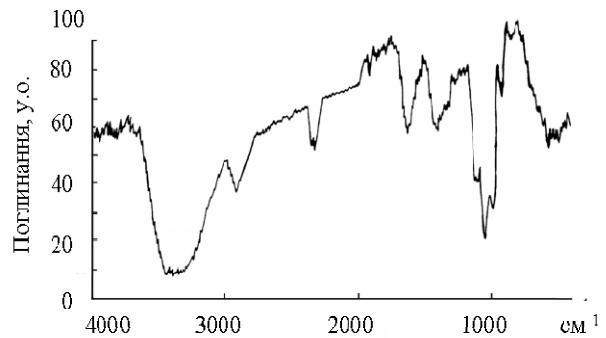


Рис. 1. ІЧ-спектр позаклітинних білків штаму НК-35 після культивування на КСС

Видно, що ІЧ-спектр позаклітинних білків має смуги поглинання при 925, 850 см⁻¹ і 690–660 см⁻¹, що характеризують С–Н зв'язок в ароматичному кільці. Смуги поглинання при 2925 і 1410 см⁻¹ свідчать про наявність С–Н зв'язку аліфатичних СН₃- і СН₂-груп. Область смуг поглинання при 1300–1000 см⁻¹ може вказувати на наявність у позаклітинних білках С–О зв'язку кисневмісних функціональних груп, а смуга поглинання при 3350 см⁻¹ характеризує водневий зв'язок ОН-груп у структурі позаклітинних білків.

Дані щодо напівкількісної оцінки позаклітинних білків ізолятів гриба *P. ostreatus* вказують: оптична щільність смуг поглинання (E) ІЧ-спектрів ліофілятів характеризується різною інтенсивністю, що пов'язано з їх фізіологічними особливостями і здатністю продукувати в живильне середовище білки, які відрізняються між собою за структурно-груповим складом (див. табл.).

Результати досліджень і дані літератури [7, 17, 19] дають підстави зробити висновок, що область поглинання при 1100–1000 см⁻¹ може характеризувати наявність у позаклітинних білках функціональних груп, які мають активний кисень (С–О зв'язок), за допомогою якого гриб *P. ostreatus* здійснює деструкцію вуглецевого субстрату. Інтенсивність смуг поглинання 1130–1040 см⁻¹ визначає фізіологічні особливості культур, їх здатність ефективно засвоювати вуглець живильного середовища.

Дані ІЧ-спектроскопії позаклітинних білків штамів гриба *P. ostreatus* після культивування на КСС

Штам (ізолят)	Оптична щільність смуг поглинання (E , відн. од.), cm^{-1}							
	3350	2920	1660–1630	1410	1130	1040	690–660	540–470
НК-35*	0,95	0,15	0,21	0,21	0,39	0,67	0,18	0,27
К-99	0,85	0,17	0,32	0,33	0,50	0,87	0,19	0,45
Р-01	0,95	0,18	0,33	0,24	0,46	0,76	0,17	0,30
В-99	0,88	0,13	0,26	0,16	0,26	0,46	0,13	0,29
ВК-2000	0,82	0,12	0,30	0,22	0,28	0,63	0,44	0,71
С-2000	1,01	0,16	0,29	0,26	0,49	0,82	0,24	0,40

Примітка: * – контроль

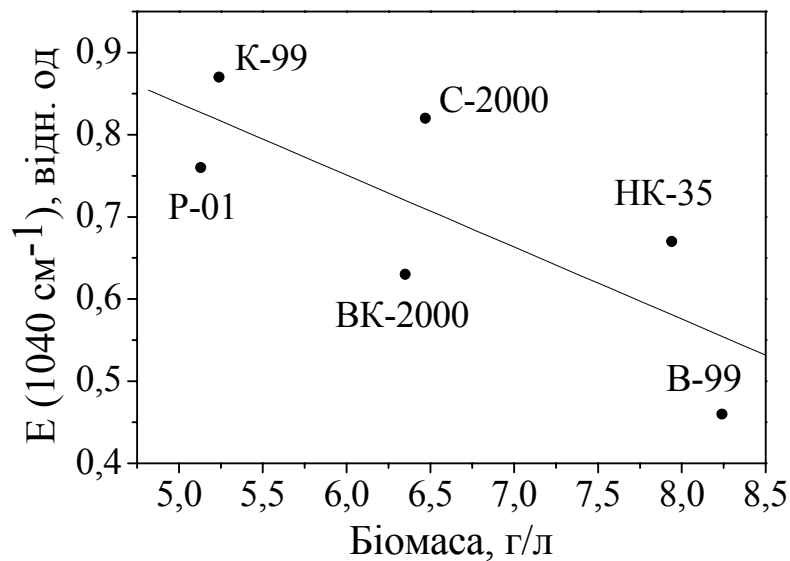


Рис. 2. Взаємозв'язок між інтенсивністю смуги поглинання при 1040 cm^{-1} і накопиченням біомаси штамами гриба *P. ostreatus* за культивування на КСС

На підставі даних ІЧ-спектроскопії та культивування гриба на КСС виявлено залежність між структурно-груповими характеристиками позаклітинних білків КР (інтенсивністю смуги поглинання при 1040 cm^{-1}) і здатністю ізолятів накопичувати біомасу за термін культивування на цьому середовищі (рис. 2).

Знайдений взаємозв'язок описується рівнянням $y = 1,277 + (-0,088)x$, а підрахований коефіцієнт кореляції R складає $-0,770$. Обернена кореляція між цими параметрами свідчить про те, що не лише кількісний склад, а й якість білків визначають фізіологічні особливості культури.

Коефіцієнти кореляції було підраховано й для інших смуг поглинання ІЧ-спектру позаклітинних білків штамів гриба *P. ostreatus*, а саме: для співвідношення біомаса/ E (1130 cm^{-1}), для якого коефіцієнт кореляції дорівнював $R = -0,65$, і для значень біомаса/ E (1410 cm^{-1}), де $R = -0,79$.

Висновки. Результати ІЧ-спектроскопії ліофілятів КР після росту на рідкому живильному середовищі з картопляно-сахарозним вуглецем гриба *P. ostreatus* доводять, що позаклітинні білки гриба, які глива звичайна продукує у живильне середовище для здійснення деструкції вуглецю живильного середовища. Запропонований метод ІЧ-спектроскопії можна практично використовувати як додатковий для якісної оцінки структурно-групового складу позаклітинних білків (при 1040 cm^{-1}) із метою виявлення нових культур гливи звичайної, які мають високі показники фізіологічної активності. Знайдена залежність між інтенсивністю смуги поглинання при 1040 cm^{-1} та здатністю гриба *P. ostreatus* накопичувати біомасу на КСС свідчить про те, що не лише кількісний склад, але й якість білків КР визначають фізіологічну ефективність культури.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. *Белами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул / Л. Белами. – М. : Изд-во иностр. лит., 1963. – 155 с.
2. *Белова Н. В.* Грибы белой гнили и возможность их использования для утилизации отходов // Н. В. Белова, Н. П. Денисова // Биотехнология. – 2005. – № 4. – С. 55–58.
3. *Бранд Д.* Применение спектроскопии в органической химии / Д. Бранд, Г. Эглингтон. – М. : Мир, 1967. – 276 с.
4. Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні: за станом на 15.04.2009 року. / Мін. агр. політики Укр., Держ. служба з охорони прав на сорти рослин. – Офіц. вид. – К. : ТОВ «Алефа», 2009. – С. 192–193. – (Бібліотека офіційних видань).
5. *Дорошкевич Н. В.* Господарсько-біологічна оцінка нових штамів гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer : автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. : спец. 06.01.06 «Овочівництво» / Н. В. Дорошкевич – К., 2010. – 20 с.
6. *Дунаевский Я. Е.* Деградация белковых субстратов ксилотрофными базидиомицетами / Я. Е. Дунаевский, Дун Чжан, А. Р. Матвеева [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 1. – С. 46–51.
7. *Кесслер И.* Методы инфракрасной спектроскопии в химическом анализе / И. Кесслер. – М. : Мир, 1964. – 287 с.
8. Методы экспериментальной микологии / [И. А. Дудка, С. П. Вассер, И. А. Элланская]; под ред. В. И. Билай. – К. : Наукова думка, 1982. – 550 с.
9. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю. Г. Приседський. – Донецьк : Кассиопея, 1999. – 210 с.
10. *Сычев П. А.* Экофизиология высших грибов / П. А. Сычев. – Донецк : Кассиопея, 2000. – 276 с.
11. *Смит А.* Прикладная ИК-спектроскопия / А. Смит. – М. : Мир, 1982. – 327 с.
12. *Цизь О. М.* Гриби – це вигідно / О. М. Цизь, О. В. Приліпка // Агросектор. – 2007. – № 4. – С. 22–23.
13. *Fernander M.* Characterization of mechanisms for coal solubilization by filamentous fungi / M. Fernander, N. Luna, I. F. Monistrol [and other] // Proceeding 9th Intern. Conf. on Coal Science, 7–12 September 1997. – Germany : Essen, 1997. – Vol. 3. – P. 1635–1638.
14. *Laborda F.* Liquefaction solubilization processes of Spanish coals by microorganisms / F. Laborda, I. F. Monistrol, N. Luna // Proceeding 9th Intern. Conf. on Coal Science, 7–12 September 1997. – Essen, Germany, 1997. – Vol. 3. – P. 1607–1610.
15. *Novak L. A.* Electrophoresis of major proteins in stromata of members of the *Sclerotiniaceae* / L. A. Novak, L. M. Kohn // Trans. Brit. Mycol. Soc. – 1988. – Vol. 91, N 4. – P. 639–647.
16. *Sorge S.* Isolation and characterisation of novel lignite attacking fungi from a former opencast mining / S. Sorge, M. Hofrichter, W. Fritsche // Proceeding 9th Intern. Conf. on Coal Science, 7–12 September 1997. – Essen, Germany, 1997. – Vol. 3. – P. 1627–1630.
17. *Stasinopoulos S. J.* Exopolysaccharide formation by isolates of *Cephalosporium* and *Acremonium* / S. J. Stasinopoulos, R. J. Seviour // Mycol. Res. – 1989. – Vol. 92, N 1. – P. 55–60.
18. *Velazquez-Ceden M. A.* Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes / M. A. Velazquez-Ceden, G. Mata, J.-M. Savoie // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2002. – 18. – P. 201–207.