

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ, БЕЛКА
И ЖЕЛАТИНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ *PLEUROTUS OSTREATUS*
ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

И.А. Ильючик, Д.С. Лавренюк, А.Г. Ковалюк, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет, irina.iliuchik@mail.ru

Аннотация. При добавлении в питательную среду мицелиальной культуры вешенки 10^{-8} – 10^{-2} М хлорида кадмия через 14 дней культивирования выявлены сложные, неоднонаправленные изменения в культуре. При концентрациях 10^{-1} М и 10^{-2} М хлорид кадмия вызвал гибель культуры. Лишь при минимальной концентрации соли кадмия выявлен небольшой стимулирующий рост эффект. CdCl_2 в концентрации 10^{-5} – 10^{-3} М вызвал снижение концентрации белка в мицелии гриба и в культуральной жидкости, тогда как внесение эффектора в меньших концентрациях $\leq 10^{-6}$ М способствовало увеличению концентрации белка в культуре. Желатинолитическая активность при концентрации ионов кадмия 10^{-3} М угнеталась и в мицелии, и в культуральной жидкости. Во всем остальном диапазоне концентраций желатинолитическая активность культуральной жидкости превышала контроль, тогда как в мицелии подобный эффект проявился только при концентрации соли 10^{-5} и 10^{-6} М, в остальных случаях также выявлено угнетение желатинолитической активности.

Ключевые слова: мицелиальная культура вешенки, кадмий, биомасса, концентрация белка, желатинолитическая активность.

Вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) – один из самых распространенных в природе вид рода *Pleurotus*, широко культивируемый в разных странах мира, в том числе в Беларуси. По объему производства плодовых тел она занимает третье место в мире. Гриб отличается быстрым ростом и выходом плодовых тел, обладает хорошими пищевыми качествами, содержит большое количество белка (в шляпке – 3,4 г, а в ножках – 2,1 г на 100 г гриба), минеральных веществ, витаминов и ряд других биологически активных веществ, необходимых для полноценного функциони-

рования организма человека [1, с. 4; 2, с. 16]. В плодовых телах вешенки содержатся 18 аминокислот, в том числе 8 незаменимых.

Грибы обладают разнообразным спектром гидролаз широкой специфичности, включая протеиназы. Это делает их привлекательными для использования в качестве энзиматического сырья в промышленности. Набор протеиназ вешенки существенно зависит от состава питательной среды и условий культивирования. Из ее плодовых тел выделены три протеиназы: сериновая протеиназа и две Zn-содержащие. Из культуральной жидкости при культивировании вешенки в жидкой питательной среде выделена экстрацеллюлярная сериновая протеиназа [3, с. 14]. Экстрацеллюлярные протеиназы выполняют функцию обеспечения мицелия источниками питания – аминокислотами и пептидами. Функция же внутриклеточных протеиназ заключается в регуляции внутриклеточных процессов и физиологии мицелия гриба [4, с. 33].

Кадмий является токсичным и тяжелым металлом. Ионы кадмия участвуют в связывании карбоксильных, аминных и сульфгидрильных групп белков, угнетают энзиматическую активность. Попадая в организм человека, они поражают центральную нервную систему, печень, почки, нарушают обмен фосфатов и витамина D₃, высвобождение кальция из костей. Отравления кадмием в высоких дозах чревато развитием отека головного мозга и острой почечной недостаточности.

Грибы способны аккумулировать тяжелые металлы из окружающей среды, что обусловлено их биохимическими особенностями, в частности их белковым составом. Вешенка легко сорбирует такие тяжелые металлы, как кадмий, свинец и хром. Это позволяет использовать данный гриб для очистки почв от загрязнений тяжелыми металлами. В литературе описано влияние ионов железа, меди, цинка, кобальта, никеля и марганца, на накопление биомассы и активность протеиназ вешенки обыкновенной при глубинном культивировании [5, 6], но о влиянии на данные процессы кадмия информации недостаточно.

Цель работы: раскрыть влияние ионов кадмия на накопление биомассы, белка и желатинолитическую активность мицелиальной культуры вешенки обыкновенной при глубинном культивировании.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на глубинной культуре «дикого» штамма вешенки обыкновенной. Гриб культивировали на стерильной картофельно-сахарозной среде [5], в стеклянных колбах на 250 мл, под ватно-марлевыми пробками, в темноте, при температуре 27 °С, на качалке с режимом перемешивания 70 об/мин. В колбы с картофельно-сахарозной средой дополнительно вносили раствор хлорида кадмия до конечных концентраций 10⁻¹– 10⁻⁸ М. В контрольный вариант соль кадмия не добавляли.

На 14-е сутки культивирования отбирали аликвоты мицелия и культуральной жидкости. Мицелий (0,1 г) гомогенизировали на льду в дистиллированной воде (0,5 мл) в течение 10 мин, гомогенаты центрифугировали в течение 10 мин, при 8000 об/мин. Протеолитическую активность полученных супернатантов определяли по лизису желатина в тонком слое агарового геля [5]. Концентрация желатина и агара в белок-агаровой смеси – по 10 г/л. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали буферный раствор трис-НСl 0,05 М, рН 7,6. Объем наносимого образца на готовые пластины – 10 мкл. Белок-агаровые пластины инкубировали при 37 °С в течение 20 часов. Зоны лизиса визуализировали обработкой пластин 1 н хлорной кислотой. Концентрацию белка определяли колориметрическим методом [5].

Полученные результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента для уровня значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Внесение ионов кадмия в концентрациях 10⁻¹ М и 10⁻² М вызвало гибель культуры вешенки. При концентрации Cd²⁺ в питательной среде 10⁻⁸ М уровень биомассы был максимальным и по сравнению с контролем возрастал на 12%. При всех других концентрациях эффектора наблюдалось снижение биомассы на 23,5–60,0% по отношению к контролю (таблица 1, рисунок).

Таблица 1. – Уровень биомассы и концентрации белка *Pleurotus ostreatus* на 14-е сутки культивирования при росте в присутствии соли кадмия, $n = 3$

Концентрация ионов Cd^{2+} , М	Биомасса, г	Концентрация белка, мкг/мл	
		в мицелии	в культуральной жидкости
Контроль	$0,68 \pm 0,05$	$206,5 \pm 0,08$	$35,10 \pm 0,14$
10^{-8}	$0,76 \pm 0,05$	$231,5 \pm 0,35$	$42,40 \pm 0,14^*$
10^{-7}	$0,48 \pm 0,05^*$	$222,5 \pm 1,55$	$42,19 \pm 0,14^*$
10^{-6}	$0,52 \pm 0,01^*$	$222,0 \pm 0,14$	$40,40 \pm 0,14^*$
10^{-5}	$0,45 \pm 0,03^*$	$168,5 \pm 0,50^*$	$38,50 \pm 0,14$
10^{-4}	$0,50 \pm 0,04^*$	$188,0 \pm 0,47$	$33,60 \pm 0,28$
10^{-3}	$0,28 \pm 0,05^*$	$174,0 \pm 0,36^*$	$26,89 \pm 0,22^*$
10^{-2}	культура погибла	–	–
10^{-1}	культура погибла	–	–

Примечание – Здесь и далее * – изменения статистически достоверны при $p \leq 0,05$

Также следует отметить, что при более высоких концентрациях (от 10^{-5} М и выше) хлорида кадмия снижалось накопление белка и в мицелии гриба, и в культуральной жидкости. Так, в концентрации 10^{-3} М Cd^{2+} снижал уровень этого показателя в мицелии и в культуральной жидкости на 18% и 23% соответственно по сравнению с контролем (таблица 1, рисунок).

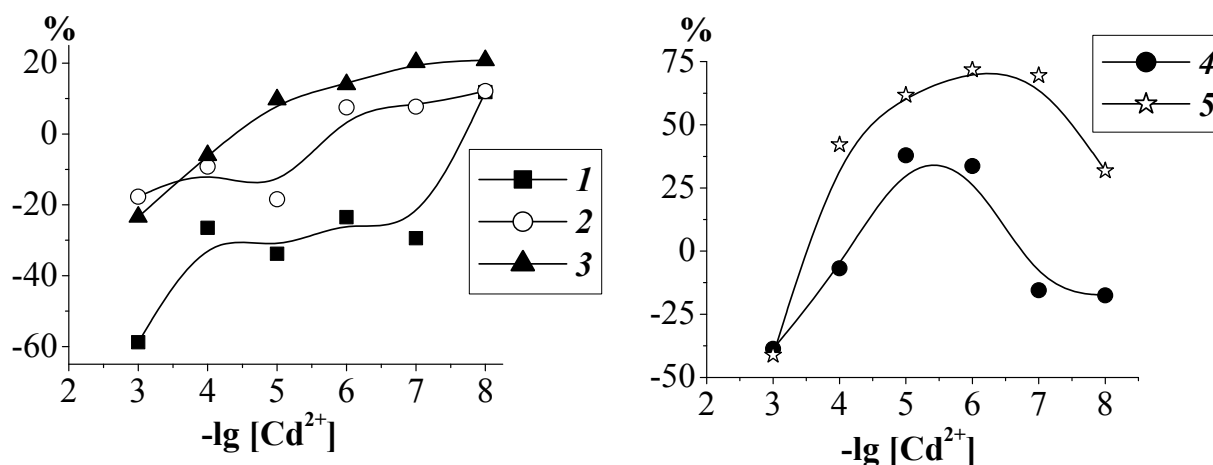


Рисунок – Влияние хлорида кадмия на изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (1), белка в мицелии (2) и культуральной жидкости (3) и желатинолитической активности гомогенатов мицелия (4) и культуральной жидкости (5) *Pleurotus ostreatus* через 14 суток роста

При концентрациях Cd^{2+} 10^{-8} М– 10^{-6} М наблюдалось увеличение концентрации мицелиального белка, а при концентрациях Cd^{2+} 10^{-8} М– 10^{-5} М – прирост белка и в культуральной жидкости. Максимальное увеличение выявлено при концентрации Cd^{2+} 10^{-8} М: в мицелии и в культуральной жидкости на 12% и 21% соответственно (таблица 1, рисунок).

Добавление в питательную среду ионов кадмия, за исключением его концентраций 10^{-6} М и 10^{-5} М, сопровождалось угнетением желатинолитической активности супернатантов гомогенатов мицелия гриба на 16–39% (таблица 2, рисунок). При концентрации же соли кадмия 10^{-6} М и 10^{-5} М эта активность возрастала на 34% и 38% соответственно.

Желатинолитическая активность протеиназ культуральной жидкости, после 14-ти суток роста вешенки в присутствии хлорида кадмия, по сравнению с контролем возрастала на 32–72% при всех концентрациях эффектора, кроме таковой при 10^{-3} М: наблюдалось ее угнетение на 41% (таблица 2, рисунок).

Таблица 2. – Влияние ионов кадмия на желатинолитическую активность (мм^2 площади зон лизиса желатина) мицелиальной культуры *Pleurotus ostreatus*, $n = 8$

Концентрация ионов Cd^{2+} , М	Желатинолитическая активность	
	мицелия	культуральной жидкости
Контроль	$144,75 \pm 4,25$	$63,0 \pm 3,77$
10^{-8}	$119,37 \pm 2,80^*$	$83,05 \pm 2,88^*$
10^{-7}	$122,35 \pm 2,45^*$	$106,80 \pm 4,30^*$
10^{-6}	$193,53 \pm 2,55^*$	$108,23 \pm 3,90^*$
10^{-5}	$199,60 \pm 3,00^*$	$101,92 \pm 2,45^*$
10^{-4}	$134,92 \pm 2,05$	$89,54 \pm 4,30^*$
10^{-3}	$88,78 \pm 1,26^*$	$37,10 \pm 1,55^*$

Заключение. Добавление в питательную среду мицелиальной культуры вешенки ионов кадмия сопровождалось проявлением достаточной сложных, неоднонаправленных изменений в культуре. При концентрациях 10^{-1} М и 10^{-2} М хлорид кадмия вызвал гибель этой культуры. В диапазоне концентраций ионов кадмия 10^{-7} – 10^{-3} М наблюдалось угнетение роста мицелия. При этом добавление хлорида кадмия в концентрации 10^{-5} – 10^{-3} М вызывало снижение концентрации белка в мицелии гриба и в культуральной жидкости, тогда как внесение эффектора в меньших концентрациях $\leq 10^{-6}$ М способствовало увеличению концентрации белка в культуре. И лишь внесение катионов кадмия в минимальной использованной концентрации способствовало небольшой стимуляции роста мицелия. Достаточно сложной была концентрационная зависимость и сдвиг желатинолитической активности. Лишь при концентрации ионов кадмия 10^{-3} М эта активность угнеталась и в мицелии, и в культуральной жидкости. Во всем остальном диапазоне концентраций желатинолитическая активность культуральной жидкости превышала контроль, тогда как в мицелии подобный эффект проявился только при концентрации соли 10^{-5} и 10^{-6} М, а в остальных случаях также выявлено угнетение желатинолитической активности.

Список использованных источников

1. Цапалова, И. Э. Дикорастущие съедобные грибы как источник белковых веществ / И. Э. Цапалова, В. И. Бакайтис // Известия вузов. Пищевая технология. – 2004. – № 1. – С. 64–65.
2. Сычев, П. А. Экофизиология высших грибов. – Д.: Кассиопея, 2000. – 276 с.
3. Омельницкая, А. В. Разработка технологии полуфабрикатов из культивируемых грибов «Вешенка обыкновенная» / А. В. Омельницкая, Е. Ф. Красноперова // Вестник инновационного евразийского университета. – 2018. – № 1. – С. 73–76.
4. Кульгавеня, А.Д. О pH-зависимости протеиназ гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании // А. Д. Кульгавеня; науч. рук. В.Н. Никандров // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XIII международной молодежной научно-практической конференции, Пинск, 5 апреля 2019 г.: в 3-х ч. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2019. – Ч. 3. – С. 60–62.
5. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная при глубинном культивировании / О. Н. Жук, И. А. Ильючик, А. Д. Кульгавеня, В. Н. Никандров // Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. – 2017. – № 2. – С. 62–68.
6. Влияние FeCl_3 , CuSO_4 , CoCl_2 , ZnSO_4 и NiSO_4 на желатинолитическую активность протеиназ мицелиальной культуры вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) / И. А. Ильючик [и др.] // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2022. – № 1. – С. 32–39.