

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**АНТИОКСИДАНТНАЯ И БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ МАКРОБАЗИДИОМИЦЕТОВ,
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ПРИСУТСТВИИ
ДИАЦЕТОФЕНОНИЛСЕЛЕНИДА И СЕЛЕНОЦИСТИНА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки IV курса 441 группы

направления 04.03.01 «Химия»

Института химии

Белобородой Анастасии Сергеевны

Научный руководитель

профессор, д.х.н., профессор

А.Н. Панкратов

подпись, дата

Зав. кафедрой

д.х.н., доцент

Т.Ю. Русанова

подпись, дата

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Настоящая работа представляет собой часть научно-исследовательских работ, проводимых на кафедре аналитической химии и химической экологии Института химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» совместно с лабораторией микробиологии учреждения Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

Базидиомицеты – один из классов царства грибов [1]. Базидиомицеты с макроскопическим размером плодовых тел называются макробазидиомицетами [2]. Последние играют исключительно важную роль как объекты промышленного выращивания в пищевых и биомедицинских целях [3]. Исследование и оптимизация процессов культивирования высших грибов является актуальной научной задачей.

Не менее важны макробазидиальные грибы как биологические объекты для выявления закономерностей функционирования, развития живых систем, их отклика на действие эффекторов различной природы [3].

Для живых организмов разных эволюционных ступеней остро стоит проблема окислительного стресса. Недостаточная активность антиоксидантной системы, не позволяющая преодолеть негативные последствия окислительного стресса (избыточный уровень свободных радикалов в клетках) – причина старения и отмирания организмов [4-6].

Ярко выраженными антиоксидантными свойствами обладают соединения селена, который является также жизненно важным микроэлементом.

Одним из показателей антиоксидантного действия служит антирадикальная активность, определяемая по реакции [7] с участием стабильного

свободного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, N,N-дифенил-N'-пикрилгидразил,ДФПГ, DPPH).

Ввиду токсичности неорганических соединений селена в качестве антиоксидантных и микроэлементных добавок при культивировании базидиомицетов перспективны селенорганические вещества.

Цель настоящей работы – квантовохимическое выявление факторов стабилизации радикала ДФПГ, установление антиоксидантного статуса культуральных жидкостей и мицелия, выяснение особенностей проявления биосинтетической активности некоторыми высшими грибами-макробазидиомицетами, выращенными с добавками селенорганических соединений.

Для достижения поставленной цели нами решены следующие **задачи**:

1. Квантовохимический расчёт пространственной и электронной структуры радикала ДФПГ с привлечением NBO-анализа, формулирование на этой основе факторов стабилизации ДФПГ.

2. Определение по реакции с ДФПГ антирадикальной активности водно-этанольных экстрактов мицелия 5 макробазидиомицетов и культуральных жидкостей 3 макробазидиальных грибов, выращенных с добавлением селенорганических соединений в среду глубинного культивирования.

3. Изучение продукции органических веществ культурами макробазидиомицетов под влиянием диацетофенонилселенида, селеноцистина и α -аминокислот, остатки которых входят в состав глутатиона.

Объём и структура работы. Работа состоит из введения, 3 глав, заключения, списка использованных источников, включающего 101 наименование, перечисления научных публикаций автора, благодарностей, описания правил техники безопасности при работе в химической лаборатории и приложений. Работа изложена на 59 страницах, содержит 7 рисунков, 3 таблицы и 10 приложений.

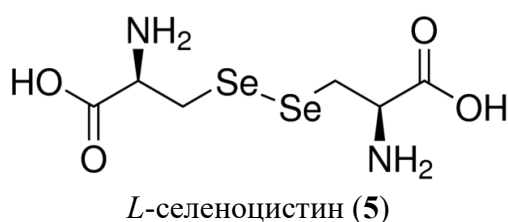
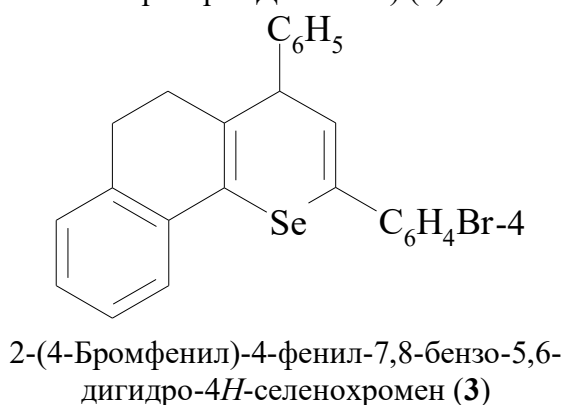
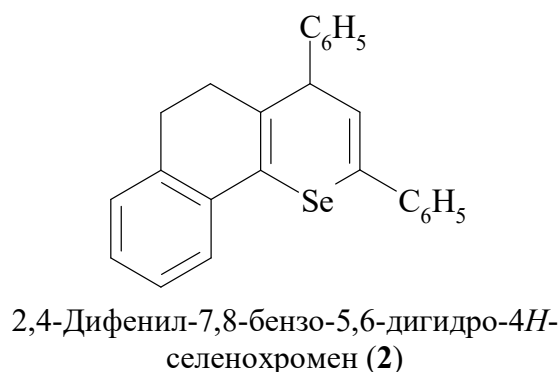
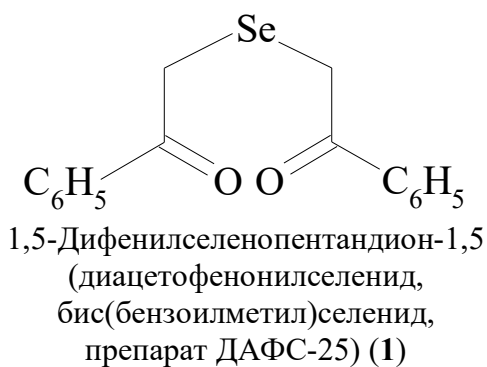
Названия глав: 1.Соединения селена и антиоксиданты в жизнедеятельности высших грибов: Обзор литературы. 2. Экспериментальная часть. 3. Результаты и их обсуждение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Соединения селена и антиоксиданты в жизнедеятельности высших грибов: Обзор литературы. Даны представления об антиоксидантах и антиоксидантной активности, обобщены свойства селена и селеносодержащих веществ как антиоксидантов.

2. Экспериментальная часть.

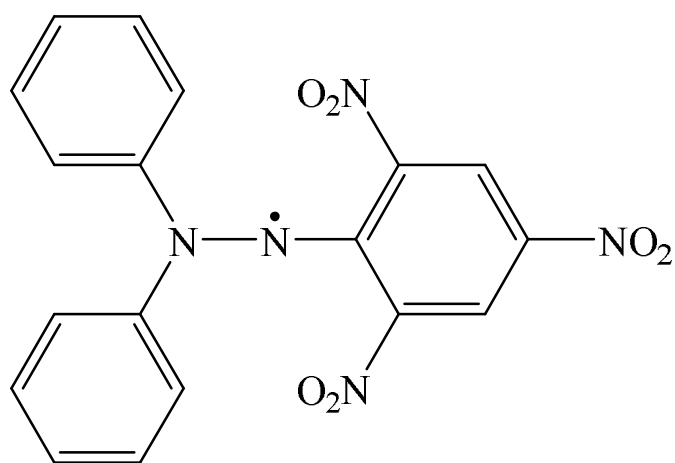
Добавками в среду глубинного культивирования служили следующие соединения селена:



Использованы культуры пяти высших грибов-макробазидиомицетов: *Laetiporus sulphureus* (трутовик серно-жёлтый), *Pleurotus ostreatus* (вешенка), *Grifola umbellata* (грифола зонтичная), *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский), *Lentinula edodes* (шиитаке), из мицелия которых готовились экстракты.

Также были взяты культуральные жидкости двенадцати штаммов макробазидиомицетов – *Ganoderma cattienensis* SIE1302, *Ganoderma neojaponicum* SIEbgm, *Ganoderma applanatum* SIE1304, *Ganoderma lucidum* 1315, *Lentinula edodes* F-249, *Ganoderma colossus* SIE1301, *Ganoderma valesiacum* 120702, *Ganoderma lucidum* SIE1303, *Pleurotus ostreatus* 69, *Lentinula edodes* 198, *Grifola umbellata* 1622, *Ganoderma applanatum* 0154.

В работе описана методика определения антирадикальной активности экстрактов мицелиев и культуральных жидкостей. Изложена методика проведения квантовохимического расчёта пространственной и электронной структуры радикалаДФПГ:



1,1-Дифенил-2-пикрилгидразил (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, N,N-дифенил-N'-пикрилгидразил,ДФПГ, DPPH)

Культуральные жидкости подвергали анализу на газовом хромато-масс-спектрометре Trace GC – Trace DSQ (газовый хроматограф Trace GC, соединенный с масс-детектором Trace DSQ) (фирма «ThermoFinnigan», США).

3. Результаты и их обсуждение

Выявлены факторы стабилизации ДФПГ: делокализация электронной и спиновой плотности, значительный по величине (сопоставимой со спиновой плотностью) отрицательный заряд на радикальном и аминном N-центрах, стерическое экранирование радикального и аминного атомов азота, ассоциация в монокристаллах в антиферромагнитные димеры без спаривания спинов электронов и образования новой связи N–N, сольватация.

По реакции с ДФПГ проанализирована антирадикальная активность экстрактов мицелиев базидиомицетов *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola umbellata*, *Ganoderma applanatum*, *Lentinula edodes* (рисунок 1).

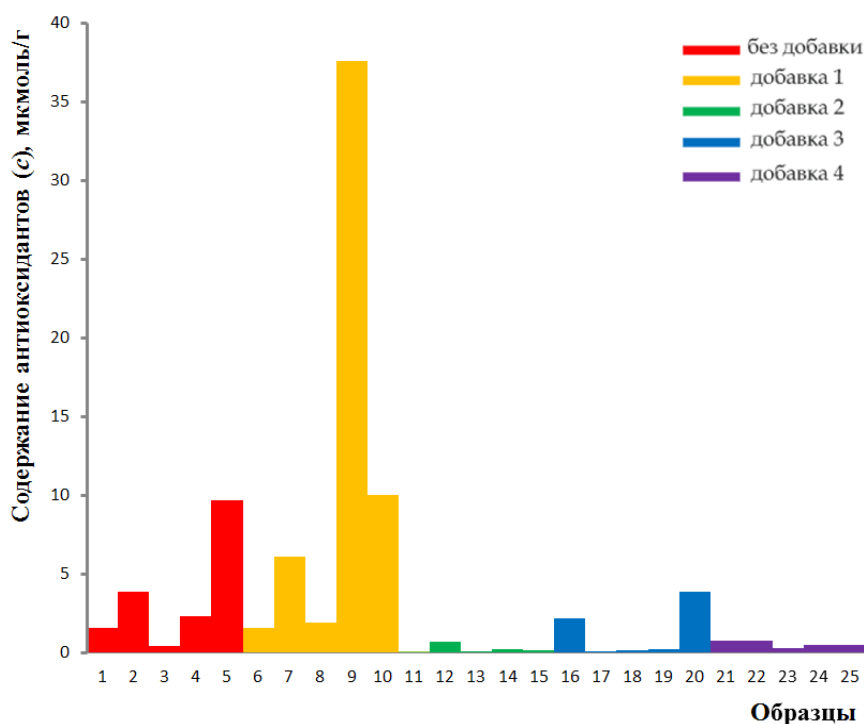


Рисунок 1 – Диаграмма содержания антиоксидантов в экстрактах мицелия. Обозначения образцов на оси абсцисс

1 – *L. sulphureus*; 2 – *P. ostreatus*; 3 – *Gr. umbellata*; 4 – *G. applanatum*; 5 – *L. edodes*;
6 – *L. sulphureus*; 7 – *P. ostreatus*; 8 – *Gr. umbellata*; 9 – *G. applanatum*; 10 – *L. edodes*;
11 – *L. sulphureus*; 12 – *P. ostreatus*; 13 – *Gr. umbellata*; 14 – *G. applanatum*; 15 – *L. edodes*;
16 – *L. sulphureus*; 17 – *P. ostreatus*; 18 – *Gr. umbellata*; 19 – *G. applanatum*; 20 – *L. edodes*;
21 – *L. sulphureus*; 22 – *P. ostreatus*; 23 – *Gr. umbellata*; 24 – *G. applanatum*; 25 – *L. edodes*

Осуществлён анализ антирадикальной активности культуральных жидкостей макробазидиомицетов, которая представлена на рисунках 2 и 3.

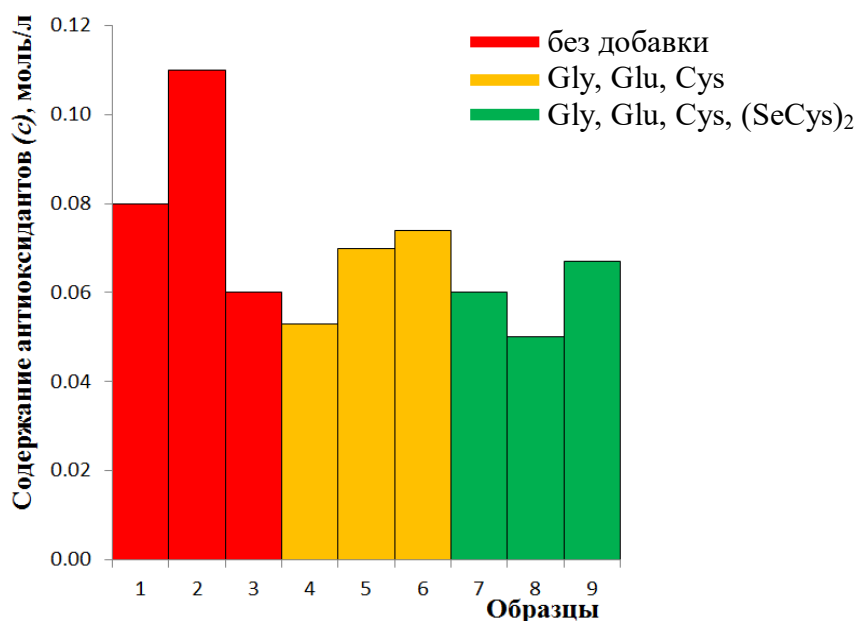


Рисунок 2 – Диаграмма содержания антиоксидантов в культуральных жидкостях.

Обозначения образцов на оси абсцисс:

- 1 – *G. applanatum* 0154; 2 – *G. lucidum* 1315; 3 – *L. edodes* F-249; 4 – *G. applanatum* 0154;
 5 – *G. lucidum* 1315; 6 – *L. edodes* F-249; 7 – *G. applanatum* 0154; 8 – *G. lucidum* 1315;
 9 – *L. edodes* F-249

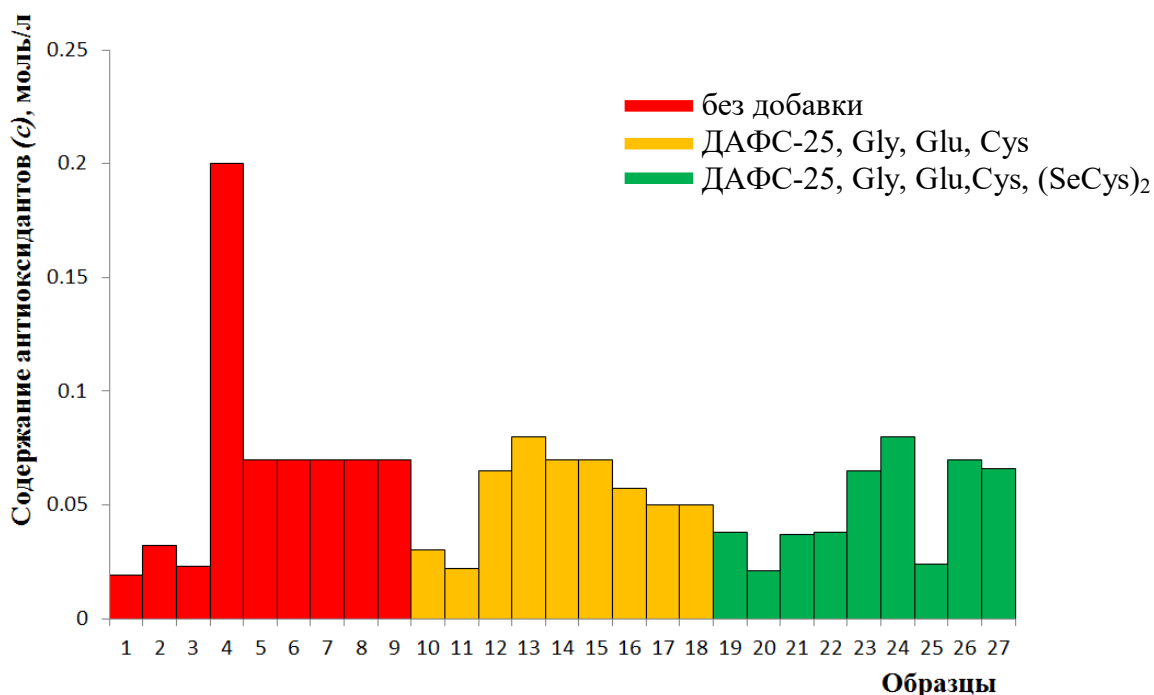


Рисунок 3 – Диаграмма содержания антиоксидантов в культуральных жидкостях.

Обозначения образцов на оси абсцисс:

- 1 – *G. cattienensis* SIE1302; 2 – *G. neojaponicum* SIEbgm; 3 – *G. applanatum* SIE1304;

4 – *G. colossus* SIE13011; 5 – *G. valesiacum* 120702; 6 – *G. lucidum* SIE1303;
7 – *P. ostreatus* 69; 8 – *L. edodes* 198; 9 – *Gr. umbellata* 1622; 10 – *G. cattienensis* SIE1302;
11 – *G. neojaponicum* SIEbgm; 12 – *G. applanatum* SIE1304; 13 – *G. colossus* SIE13011;
14 – *G. valesiacum* 120702; 15 – *G. lucidum* SIE1303; 16 – *P. ostreatus* 69; 17 – *L. edodes* 198;
18 – *Gr. umbellata* 1622; 19 – *G. cattienensis* SIE1302; 20 – *G. neojaponicum* SIEbgm;
21 – *G. applanatum* SIE1304; 22 – *G. colossus* SIE13011; 23 – *G. valesiacum* 120702;
24 – *G. lucidum* SIE1303; 25 – *P. ostreatus* 69; 26 – *L. edodes* 198; 27 – *Gr. umbellata* 1622

Методом ГХ-МС исследованы культуральные жидкости штамма *Ganoderma applanatum* 0154 без химических добавок и с добавлением α -аминокислот в среду культивирования. Среди веществ-метаболитов – производные бензола, 1,2-циклопентандиона, 1,2-циклопентендиона, фурана, 2,3-дигидрофурана, 1,3-диоксолана, 4*H*-пирона, 2,3-дигидро-4*H*-пирона, а также глутаконовый ангидрид и линолевая кислота. В ряде случаев обнаруживалось соединение ряда 4*H*-дигидропирона – структурный аналог койевой кислоты – ингибитора меланиногенеза у грибов, который имеет место в условиях окислительного стресса. Аминокислоты индуцировали также биохимические процессы, приводящие к увеличению содержания кориллона.

ВЫВОДЫ

1. На уровне теории UB3LYP/6-311++G(3df,3pd) с привлечением NBO-анализа рассмотрена пространственная и электронная структура радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ). В соответствии с критерием конъюгации в сопряжённых фрагментах ДФПГ угол поворота вокруг связи симбатно коррелирует с её длиной.

2. Факторами стабилизации радикала, обуславливающими его устойчивость и свойства как реагента, взаимодействующего с другими радикалами за промежутки времени, удобные для регистрации аналитических сигналов, являются делокализация электронной и спиновой плотности, значительный по величине (сопоставимой со значением спиновой плотности) отрицательный заряд на радикальном и аминном N-центрах, стерическое экранирование радикального и аминного атомов азота, ассоциация в монокристаллах в анти-

ферромагнитные димеры без спаривания спинов электронов и образования новой связи N–N, сольватация.

3. По реакциям с ДФПГ проанализирована антирадикальная активность экстрактов мицелия макробазидиомицетов *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola umbellata*, *Ganoderma applanatum*, *Lentinula edodes*. Установлено, что положительное влияние на антирадикальную активность грибных культур оказывает диацетофенонилселенид, селенсодержащий фрагмент молекулы которого имеет открытоцепное строение. Напротив, вещества, содержащие селен в цикле – дигидроселенохромены и соль дигидроселенохромилия – снижают антирадикальную активность культур. Диацетофенонилселенид, в противоположность селенсодержащим гетероциклическим соединениям, перспективен в качестве антиоксидантной и микроэлементной добавки при культивировании базидиомицетов.

4. Наиболее выраженный позитивный эффект в отношении роста антирадикальной активности экстрактов мицелия при добавлении диацетофенонилселенида в среду культивирования отмечается для базидиомицета *Ganoderma applanatum*. Макробазидиальный гриб *Lentinula edodes* характеризуется сравнительно высокой антирадикальной активностью даже без добавки. Остальные рассмотренные высшие грибы не проявили отчётливой дифференциации эффективности антиоксидантных систем организмов.

5. Проведён анализ антирадикальной активности культуральных жидкостей серии грибов-макробазидиомицетов (12 штаммов). Добавление в среду культивирования одновременно глицина, *L*-глутаминовой кислоты и *L*-цистеина, либо совокупности названных веществ и *L*-селеноцистина, для различных штаммов приводит к росту или снижению антирадикальной активности.

6. Комбинированная добавка «диацетофенонилселенид + глицин + *L*-глутаминовая кислота + *L*-цистеин» разнообразно влияет на антирадикальную активность культуральных жидкостей. Наибольшая разность значений антирадикальной активности культуральных жидкостей макробазидиомице-

тов по сравнению с образцами без добавок наблюдается при добавлении в среду культивирования совокупности веществ «диацетофенонилселенид + глицин + *L*-глутаминовая кислота + *L*-цистеин + *L*-селеноцистин». Это может объясняться синергетическим эффектом, вызванным одновременным присутствием двух соединений, содержащих селен.

7. Методом ГХ-МС исследованы культуральные жидкости штамма *Ganoderma applanatum* 0154 без химических добавок и с добавлением α -аминокислот в среду культивирования. Среди веществ-метаболитов – производные бензола, 1,2-циклопентандиона, 1,2-циклопентендиона, фурана, 2,3-дигидрофурана, 1,3-диоксолана, 4*H*-пирона, 2,3-дигидро-4*H*-пирона, а также глутаконовый ангидрид и линолевая кислота.

В качестве биохимического отклика грибной культуры на присутствие в составе исходной питательной среды выращивания α -аминокислот, остатки которых входят в состав глутатиона, выявлены 2,4-дигидрокси-2,5-диметил-3(2*H*)-фуран-3-он, 4-этил-1,3-диоксолан, 2-метил-4-гидрокси-1,3-циклопентандион, 3,5-дигидрокси-2-метил-4*H*-пиран-4-он, 3,5-дигидрокси-6-метил-2,3-дигидро-4*H*-пиран-4-он (структурный аналог койевой кислоты), производные корилона.

8. Вероятно, антиоксидантные свойства глицина, *L*-глутаминовой кислоты, *L*-цистеина и *L*-селеноцистина реализуются с участием корилона. Последний выполняет двойную роль в зависимости от про/антиоксидантного статуса грибной культуры. Этому способствует двойственная природа корилона, который с одной стороны является структурным (топологическим) аналогом аскорбиновой кислоты, известного антиоксиданта, а с другой – дикарбонильным соединением, прооксидантом, медиатором пероксидного окисления липидов.

9. Опубликованы четыре статьи в реферируемом сборнике научных трудов (2016 г.) и тезисы доклада XXIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017». Принята к опубликованию статья в журнале «Известия Саратовского университета. Но-

вая серия. Серия: Химия. Биология. Экология». Подготовлена к печати статья для российского академического журнала.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Мюллер Э., Лёффлер В. Микология / Пер. с нем. К.Л. Тарасова. М.: Мир, 1995. 343 с.
2. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов / Науч. ред. З.А. Туркова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 230 с.
3. Билай В.И. Основы общей микологии. Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. 360 с.
4. Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Net-work: An Overview // Current Pharmaceutical Design. 2004. Vol. 10, № 14. P. 1677-1694.
5. Apel K., Hirt H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction // Annu Rev. Plant Biol. 2004. Vol. 55. P. 373-399.
6. Mishra V., Shah Ch., Mokalsh N., Chavan R., Yadav H., Prajapati J. Pro-biotics As Potential Antioxidants: A Systematic Review // J. Agric. Food Chem. 2015. Vol. 63, № 14. P. 3615-3626.
7. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А., Румянцева Н.И. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений. Казань: Казанск. (При-волжский) Федеральный ун-т, Биолого-почвенный ф-т, кафедра генетики, 2011. 61 с.