

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

Науковий часопис Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова.
Серія 20. Біологія. – 2015. – випуск 6. – С. 57 - 62

УДК 57.025:582.284:664.66.002.68

Іванова Т.С., Мегалінська Г.П.

ГЕМАГЛЮТИНУВАЛЬНА ТА ФІТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ *SHIZOPHYLLUM COMMUNE* ПРИ ГЛИБИННОМУ КУЛЬТИВУВАННІ НА СУХАРНІЙ КРИХТІ

Наведені результати експериментальних досліджень гематоглітинувальної та фітотоксичної активності міцелію лікувального гриба *Shizophyllum commune* при глибинному культивуванні на сухарній крихті. Встановлена їх безпечна основа для дієтичних добавок з лікарськими властивостями.

Shizophyllum commune, гематоглітинувальна активність, фітотоксична активність, глибинне культивування, сухарна крихта.

Біологічно активні речовини лікарських грибів відділу *Basidiomycota* виявляють широкий спектр терапевтичних властивостей, зокрема, імуномодельовальну, протипухлинну та антибактеріальну активність [1]. Лікарські базидіальні гриби мають високу харчову цінність (містять збалансований комплекс амінокислот та жирних кислот, вітамінів, мінеральних речовин, харчові волокна) та зрідка призводять до негативних наслідків впливу на здоров'я людини [2]. Деякі гриби містять лектини, які вибірково зв'язуються з вуглеводними детермінантами. Встановлено, що лектини лікарських грибів можуть селективно спричинювати до апоптозу в пухлинних клітинах та мітогенно впливати на імунокомпетентні клітини (пришвидшувати мітоз) [3]. Водночас, вважають [4], що вживання грибів з вмістом лектинів, які склеюють АВО-специфічні вуглеводні детермінанти на поверхні клітин організму людини, може негативно впливати на здоров'я. Скринінг наявності таких лектинів проводять за реакцією гематоглітинації еритроцитів чотирьох груп крові людини.

Для скринінгу цитостатичної активності та токсичності сполук зручним тест-об'єктом є ріст коренів рослин внаслідок простоти обробки розчинами досліджуваних сполук, більш легкого проникнення їх усередину кореня, а також вищої чутливості клітин коренів до більшості токсичних речовин, у порівнянні з наземними органами рослин [5]. При цьому, цитостатики інгібують утворення бічних коренів, а високотоксичні сполуки на нього не впливають, зупиняючи ріст головних коренів. Серед тест-об'єктів, що використовуються для дослідження цитостатичної активності,

нами було обрано огірок звичайний (*Cucumis sativus*), для якого є характерним ранній розвиток бічних коренів.

Склад та властивості грибів залежать не лише від виду та штаму грибів, а й від умов та субстрату для культивування. Так, гриби, які ростуть на забруднених територіях, не можна вживати в їжу, адже структурні полісахариди клітинної стінки, насамперед, хітин-глюкановий комплекс, мають високі сорбційні властивості [6], що вбирають важкі метали, радіонукліди та отрути. Тому найбезпечніше вживати в їжу гриби, вирощені в штучних умовах, на екологічно чистому субстраті. Одним із таких субстратів є сухарна крихта – відхід, що утворюється при виробництві хліба. Цей субстрат ефективно утилізується грибами через високий вміст легкодоступних вуглеводів та утворення однорідної суспензії у воді.

У попередній роботі [7] нами було показано, що серед досліджуваних лікарських грибів *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. утворює найбільшу кількість біомаси на середовищі з сухарною крихтою. *S. commune* – широко поширений умовно їстівний тильованих ліко гриб (його плодові тіла вживаються в їжу в тропічних країнах), із добре вивченими лікарськими властивостями, належить до відділу *Basidiomycota*. Із культуральної рідини *S. commune* було виділено β-D-глюкан шизофілан, що пройшов клінічні дослідження для використання як протипухлинний препарат.

Метою даної роботи було дослідити гемаглютинувальну та фітотоксичну активність біомаси *S. commune* 1768, отриманої при глибинному культивуванні на сухарній крихті у порівнянні з гемаглютинувальною та фітотоксичною активністю субстрату (сухарної крихти).

Матеріал і методика досліджень

Штам *S. commune* 1768 був отриманий з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ти. М.Г. Холодного НАН України [8]. Субстратом для глибинного культивування була сухарна крихта з суміші хлібів із пшеничного та житнього борошна із Хлібокомбінату № 12, ПАТ «Київхліб», м. Київ, Україна. Рідке поживне середовище з сухарною крихтою стерилізували 40 хв при 1 атм.

Міцелій грибів пересівали на чашки Петрі з глюкозо-пептоно-дріжджовим агаризованим середовищем, г/л: глюкоза – 25, пептон – 3, дріжджовий екстракт – 2, KH_2PO_4 – 1, K_2HPO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,25 та агар-агар – 20. Середовище із міцелієм повністю колонізованої чашки Петрі гомогенізували та використовували як інокулюм (10 % об.) для засіву 250 мл колб Ерленмеєра із 50 мл рідкого середовища з сухарною крихтою у концентрації 60 г/л. Колби інкубували при 28 ± 2 °C на качалці при 120 об./ ти. Міцелій в активній фазі росту пересівали (10 % об.) на середовище такого ж складу для елімінування лаг-фази (затримки росту). Для отримання максимальної біомаси міцелій культивували 4 доби. Потім міцеліальну масу відділяли від культуральної рідини фільтруванням, промивали 3 рази водою, висушували при 60 °C та перемелювали.

Для приготування лектиновмісної витяжки [9] брали 1 г сухого міцелію або сухарної крихти, додавали 10 мл 0,9 % NaCl, перемішували 2 години, центрифугували при 6 тис. об./ ти та фільтрували. 10 мл лектиновмісної витяжки додавали 1:1 до крові людини чотирьох груп, перемішували та давали відстоятися 1 годину в капілярах Панченкова, після чого вимірювали ступінь осадження еритроцитів (мм) у порівнянні з контролем (кров такої ж групи без додавання витяжки).

Екстракт гарячою водою отримували при кип'ятінні 3 хв сухого міцелію або сухарної крихти у співвідношенні 5 г на 100 мл дистильованої води. Визначення фітотоксичної активності екстрактів гарячою водою сухарної крихти та *S. commune* проводили за описаною методикою [10]. Насіння огірка сорту «Ніжинський»

розкладали по 10 шт. на фільтрувальний папір у чашки Петрі та заливали 10 мл розчину екстрактів у градієнті концентрацій з дистильованою водою від 1:9 до 9:1, що відповідає концентраціям біомаси для отримання екстрактів від 5 до 45 мг/мл. Контролем вважали дистильовану воду. Кількість бічних та довжину головного кореня вимірювали після 10 діб інкубування насіння огірка при 20 ± 2 °C.

Повторність дослідів трикратна. Числові дані наведені в формі середньої величини зі стандартною похибкою ($M \pm m$). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стьюдента (t).

Результати досліджень та їх обговорення

Екстракт фізіологічним розчином міцелію *S. commune*, одержаного при глибинному культивуванні на поживному середовищі з сухою крихтою, не виявляв гемаглютинувальну активність до чотирьох груп крові людини по відношенню до контролю (тиль. 2). Водночас, результати досліджень [11] свідчать, що екстракт плодівих тіл *S. commune* аглютинує еритроцити крові людини без групової селективності.

Таблиця 1

Гемаглютинувальна активність *S. commune* 1768 та сухою крихти

Вид сировини	Осадження еритроцитів ¹ , мм			
	I група крові	II група крові	III група крові	IV група крові
<i>S. commune</i> ²	2±1	2±1	2±1	2±1
Сухою крихта ³	12±3	9±1	11±2	10±1

Примітка: ¹ – осадження еритроцитів у контрольних зразках становило 2±1 мм для всіх груп крові; ² – в ряду значення достовірно не відрізняються від контролю та між собою, $p < 0,05$; ³ – в ряду значення достовірно відрізняються від контролю, але не відрізняються між собою, $p < 0,05$.

Показано, що гемаглютинувальна активність грибних екстрактів залежить від таксономічної належності культур, способу культивування (рідинне, тильованих) [12], а також від складу поживного середовища [13]. При цьому, відмічається [14] значне підвищення тильовани активності при використанні субстратів, несприятливих для росту міцелію, що, ймовірно, має адаптивне значення.

Екстракт субстрату для культивування грибів (сухою крихти) осаджував еритроцити без групової селективності (тиль. 2). Мабуть, це пояснюється активністю лектину зародків пшениці, який аглютинує еритроцити людини без групової селективності [15], і міститься, зокрема, у висівках, а отже, є компонентом відходів хліба. Таким чином, сухою крихта виявляє гемаглютинувальну активність, але не сприяє виникненню тильовани активності біомаси *S. commune*, отриманої при глибинному культивуванні сухою крихти, так як добре утилізується цими грибами.

Результати досліджень показали (рис. 1, 2), що при концентраціях екстракту гарячою водою міцелію *S. commune* понад 35 мг/мл кількість бічних коренів зменшилась на 36-50 % у порівнянні з контролем. Водночас, лектиновмісні екстракти плодівих тіл *Agaricus bisporus* та *Boletus edulis* при таких концентраціях повністю зупиняли утворення бічних коренів на моделі проростків огірка [16].

При застосуванні концентрацій екстракту міцелію *S. commune* 10, 15 та 25 мг/мл спостерігалось подовження головних коренів проростків огірка в 2,2-2,8 рази у порівнянні з контролем, дані статистично відрізнялось від контролю ($p < 0,05$). При

концентраціях 20, 30, 35 і 45 мг/мл спостерігалась тенденція до подовження головних коренів проростків огірка. Отримані результати свідчать про відсутність загальної токсичності екстракту *S. commune* на проростки огірка.

При цьому екстракт сухарної крихти достовірно (при $p < 0,05$) не впливає ні на кількість бічних коренів, ні на довжину головного кореню у порівнянні з контролем.

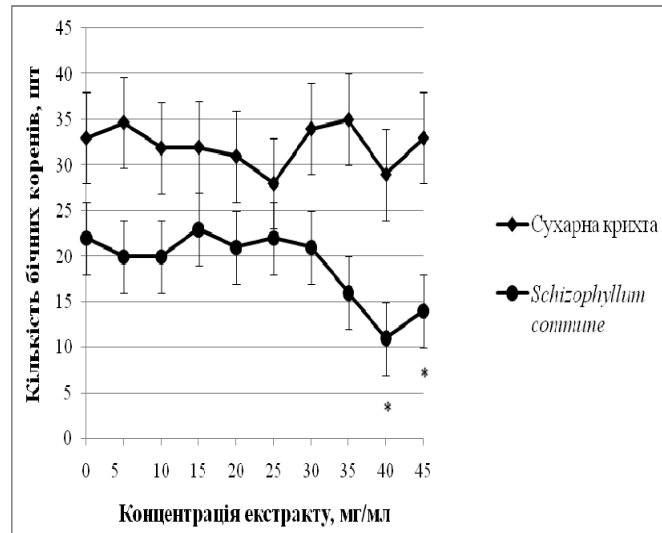


Рис. 1. Вплив концентрації водних екстрактів міцелію *S. commune* 1768 та сухарної крихти на кількість бічних коренів огірка (0 – контроль, вода)
Примітка: * - значення достовірно відрізняються від контролю, $p < 0,05$.

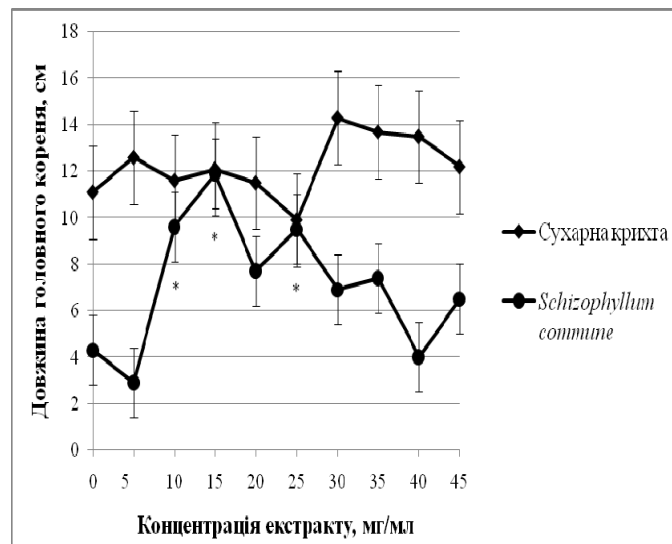


Рис. 2. Вплив концентрації водних екстрактів *S. commune* 1768 та сухарної крихти на довжину головного кореня огірка (0 – контроль, вода)
Примітка: * - значення достовірно відрізняються від контролю, $p < 0,05$.

Висновки

Сухарна крихта – це новий субстрат, що є компонентом поживного середовища для глибинного культивування *S. commune* 1768.

Екстракт субстрату сухарної крихти володіє гемаглютинувальною активністю по відношенню до чотирьох груп крові людини, проте подібна активність екстракту

міцелію *S. commune*, отриманого при глибинному культивуванні на сухарній крихті, не виявлена.

Екстракти гарячою водою міцеліальної маси *S. commune*, отриманої при глибинному культивуванні на сухарній крихті, проявляють цитостатичну активність на моделі кореня огірка при високих концентраціях та стимулюють ріст головного кореня при нижчих концентраціях. Водночас, екстракт гарячою водою сухарної крихти не має цитостатичної активності та не впливає на довжину головного кореня.

Використана література:

1. Wasser S.P. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review) / S.P. Wasser, A.L. Weis // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 1999. – Vol. 1. – P. 31-62.
2. Mushrooms as Functional Foods / Ed. by P.C.K. Cheung. – New York: Wiley, 2008. – 259 p.
3. Xu X. Bioactive proteins form mushrooms / X. Xu, H. Yan, J. Chen, X. Zhang // Biotechnology Advances. – 2011. – Vol. 29. – P. 667-674.
4. Crisan E.V., Sands A.A. Nutritional value / Ed. by S.T. Chang, W.A. Hayes // The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. – New York: Academic Press. – 1978. – P. 137-168.
5. Иванов В.Б. Использование корней как тест-объектов для оценки биологического действия химических соединений / В.Б. Иванов // Физиология растений – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 944-952.
6. Бабицкая В.Г. Плодовые тела лекарственных грибов: физиологически тильов соединения, сорбционный тильован / В.Г. Бабицкая, В.В. Трухоновец, Т.А. Пучкова, В.В. Щерба, Н.В. Иконникова, Т.В. Филимонова, О.В. Осадчая // Иммунопатология, тильованих, инфектология. – 2009. - № 2. – С. 160-161.
7. Иванова Т.С. Скринінг лікарських грибів при культивуванні на відходах харчової промисловості України / Т.С. Иванова, Т.А. Круподьорова, В.Ю. Барштейн, Г.П. Мегалінська // Науковий часопис НПУ імені М.П. Драгоманова. Серія 20. Біологія. – 2012. – № 4. – С. 113-119.
8. Бухало А.С. Каталог колекції культур шапинкових грибів (ІВК) / А.С. Бухало, Н.Ю. Митропольская, О.Б. Михайлова. – К.: Альтерпрес, 2011. – 100 с.
9. Луцик А.Д., Панасюк Е.Н., Луцик М.Д. Лектины. – Львов: Высшая школа. – 1981. – 156 с.
10. Иванов В.Б. Проростки огурца как тест-объект для обнаружения эффективных цитостатиков / В.Б. Иванов, Е.И. Быстрова, И.Г. Дубровский // Физиология растений – 1986. – Т. 33, № 1. – С. 195-199.
11. Chumkhunthod P. Lectins from Tropical Mushrooms. Ph.D. Thesis. Suranaree University of Technology, Thailand, 2005. – 208 p.
12. Степанова Л.В. Гемагглютинирующая активность некоторых базидиальных ксилотрофов на стадии дикариотического мицелия / Л.В. Степанова, О.М. Цивилева, В.Е. Никитина, Е.А. Лоцинина, Л.В. Гарибова, Е.В. Тюрюкина // Микология и тильованих л. – 2006. – Вып. 4. – С. 307-313.
13. Цивилева О.М. Влияние состава среды культивирования на активность внеклеточных лектинов *Lentinus edodes* / О.М. Цивилева, В.Е. Никитина, Л.В. Гарибова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 2. – С. 200-203.
14. Никитина В.Е. Стимуляторы лектиновой активности *Lentinus edodes* на синтетических агаризованных тильов / В.Е. Никитина, О.М. Цивилева, Л.В. Гарибова // Биотехнология. – 2004. – № 3. – С. 49-54.

15. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Львів: Кварт. – 2005. – 554 с.
16. Мегалінська Г.П. Літична, антибактеріальна та цитостатична активність лектинів деяких лікарських рослин / Г. П. Мегалінська, К. П. Ільєнко, Н. У. Желтовська // Природничі науки на межі століть: матеріали наук.-практ. конф., 23-25 бер. 2004. – Ніжин, 2004. – С. 64-65.

Т.С. Иванова, А.П. Мегалинская

ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ И ФИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *SHIZOPHYLLUM COMMUNE* ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СУХАРНОЙ КРОШКЕ

Shizophyllum commune – хорошо известный лекарственный гриб, проявляющий, в частности, иммуномодулирующие и противораковые свойства, относится к отделу *Basidiomycota*. Целью данной работы было исследовать гемагглютинирующую и фитотоксичную активность биомассы *S. commune* 1768, полученной при глубинном культивировании на сахарной тилье в сравнении с гемагглютинирующей и фитотоксичной активностью субстрата (сахарной крошки). Наши исследования показали, что гемагглютинация эритроцитов крови человека нативным тильевым мицелием статистически не отличалась от контроля. В то же время, сахарная крошка агглютинировала эритроциты крови человека без групповой селективности, вероятно, благодаря наличию лектина зародышей пшеницы. Экстракт горячей водой *S. commune* проявлял цитостатическую активность при тильевании в выше 35 мг/мл, а для сахарной крошки не была тильево цитотоксическая активность на модели корней огурца. Таким образом, мицелий *S. commune*, полученный при глубинном культивировании на сахарной тилье – безопасная основа для диетических добавок и функциональных продуктов с лекарственными свойствами.

T.S. Ivanova, G.P. Megalinska

HEMAGGLUTINATING AND PHYTOTOXIC ACTIVITY OF SUBMERGED CULTIVATED *SHIZOPHYLLUM COMMUNE* ON BREADCRUMB

Shizophyllum commune is a well-known medicinal fungus belonging to phylum *Basidiomycota* and, in particular, possess immunomodulating and anticancer activity. The purpose of the present work was to investigate hemagglutinating and phytotoxic activities of submerged cultivated *S. commune* mycelia grown on breadcrumb (waste of bread production) in comparison with such activities of substrate – breadcrumb. Our findings have shown that human erythrocyte hemagglutination with crude mycelia extracts didn't significantly differ from control. At the same time, breadcrumb agglutinated human blood erythrocytes without group selectivity, perhaps, due to the presence of wheat germ lectin. *S. commune* hot water extract showed cytostatic activity at concentrations higher 35 mg/ml, and breadcrumb didn't show any cytostatic activity using cucumber root as a model. Hence, submerged cultivated on breadcrumb *S. commune* mycelia can be assumed safe base for dietary supplements and functional foods, which possess medicinal properties.

Надійшла 10.04.2015 р.