



В.М. ЛІНОВИЦЬКА¹, А.С. БУХАЛО²

¹ Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», факультет біотехнології і біотехніки, кафедра промислової біотехнології
пр-т Перемоги, 37, м. Київ, 03057, Україна
y@mail@bigmir.net

² Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, Україна

**PICT I BIOSИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ
GRIFOLA FRONDOSA (DICKS: FR.)
S.F. GRAY TA *SCHIZOPHYLLUM
COMMUNE* FR. (BASIDIOMYCOTA)
У ГЛИБИННІЙ КУЛЬТУРІ**

Ключові слова: *Grifola frondosa*, *Schizophyllum commune*, глибинне культивування, біомаса, екзополісахариди, комплексні живильні середовища, целюлолітичні ферменти

Вступ

Актуальним напрямком сучасних мікологічних та біотехнологічних досліджень є пошук нових біологічно активних препаратів з лікувально-профілактичною дією і організмів-продуцентів для їх отримання. Особливе місце серед таких речовин займають β -D-глюкани — сполуки, що продукуються базидіальними макроміцетами і мають імуномодулюючу, протипухлинну, антибактерійну, антивірусну, протизапальну та гепатопротекторну дію [7, 9, 10].

Серед вищих дереворуйнуючих істівних базидіальних грибів найважливішими продуцентами β -D-глюканів є *Schizophyllum commune* Fr. та *Grifola frondosa* (Dick: Fr.) S.F. Gray. За обсягами промислового виробництва лікувально-профілактичних препаратів вони входять до

світової п'ятірки макроміцетів, на основі яких отримують низку протипухлинних засобів: Sonifilan, SPG та Schizofyllan з культуральної рідини *S. commune* та грифолан, грифрон та ін. з біомаси *G. frondosa* [8–11].

Більшість біологічно активних речовин, які отримують з цих грибів, виробляють, застосовуючи глибинне культивування, але даних щодо умов культивування та фізіолого-біохімічних особливостей штамів у глибинній культурі в літературі мало. Тому дослідження вітчизняних штамів *G. frondosa* та *S. commune* у таких умовах є важливим етапом створення в Україні сучасних біотехнологій отримання препаратів з лікувально-профілактичною дією.

Метою цієї роботи було дослідження штамів *G. frondosa* та *S. commune* в умовах глибинного культивування на різних середовищах, визначення фізіолого-біохімічних особливостей цих грибів і виявлення основних факторів, що сприяють накопиченню біомаси та цільових метаболітів, а саме екзополісахаридів, у культуральному середовищі.

Об'єкти та методика досліджень

Об'єктом досліджень були штами *Grifola frondosa* (Dick's: Fr.) S.F. Gray та *Schizophyllum commune* Fr. з колекції Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, ізольовані авторами протягом 2000–2002 рр. з природних локалітетів в Україні та відібрані за ростовими показниками і широким спектром ферментативної активності при вирощуванні на агаризованих живильних середовищах: *G. frondosa* 332 та 1794 і *S. commune* 441, 1714, 1760 та 5009 [3, 4].

Глибинне культивування проводили в колбах Ерленмеєра 100, 250 або 750 мл за умов постійного перемішування з допомогою орбітальної качалки (60 об/хв. для *G. frondosa* та 200 об/хв. для *S. commune*) і температури +28 °C. Колби інокулювали попередньо отриманою глибинною культурою в кількості 10 об'ємних відсотків.

Мінеральною основою для глибинного культивування було рідке середовище такого складу (г/дм³): NH₄NO₃ — 3; KH₂PO₄ — 1; K₂HPO₄ — 1; MgSO₄ · 3H₂O — 0,6 [1]. При цьому для різних варіантів дослідів як ростові фактори та додаткові джерела азоту і вуглецю вносили в кількості, еквівалентній 20 г/дм³ глюкози, один з таких компонентів: пивне сусло, бурякову мелясу, кукурудзяний екстракт (КЕ), пептон, екстракт кормових дріжджів (ЕКД). Контрольне середовище містило глюкозу.

Для відбору оптимальних для накопичення біомаси джерел вуглецю використовували те саме мінеральне середовище, до якого, як єдине джерело вуглецю (в кількості, еквівалентній 20 г/дм³ глюкози) додавали інулін, ксилозу, лактозу, мальтозу, манніт, крохмаль, сахарозу, фруктозу. Оптимальні джерела азоту визначали на середовищі такого складу (г/дм³): глюкоза — 20; KH₂PO₄ — 1; K₂HPO₄ — 1; MgSO₄ · 3H₂O — 0,6, до якого як джерело азоту (в еквіваленті 3 г/дм³ NaNO₃) додавали: гістидин, лейцин, лізин, триптофан, пептон, NaNO₃, NH₄NO₃, NaNO₂, NH₄Cl. Критерієм впливу джерел вуглецю та азоту на ріст штамів було накопичення біомаси, яку визначали ваговим методом, висушуючи міцелій до постійної ваги за температури +105 °C [5].

Протягом культивування на комплексних середовищах відбирали проби культуральної рідини. У пробах визначали рН, вміст редуруючих речовин (РР) методом Хагедорна—Йенсена [6] та вміст білка методом Лоурі [5]. Крім цього, було визначено активність гідролітичних ферментів, таких як ендо-1,4- β -глюканаза, за рівнем утворення глюкози в інкубованій суміші з 0,3 % карбоксиметилцелюлози (КМЦ-активність) [5] та екzogлюканази — за рівнем гідролізу фільтрувального паперу (ФП-активність) [5].

Концентрацію екзополісахаридів визначали осадженням 5 мл культуральної рідини 10 мл 96 %-го етанолу та відстоюванням упродовж доби у холодильнику. Після цього осад відцентрифугували протягом 25 хвилин при 6—7 тис. об./хв., розчиняли в 5 мл гарячої дистильованої води та відбирали 2 мл розчину, в якому визначали кількість екзополісахаридів фенол-сірчанним методом [2].

Усі дослідження виконувалися в трьох повторах та статистично обчислювалися.

Результати досліджень та їх обговорення

Визначення впливу різних джерел вуглецю й азоту на ріст штамів *G. frondosa* 332 та *S. commune* 1760 (рис. 1) показало, що для росту штаму *G. frondosa* кращим джерелом вуглецю (рис. 1, а) були глюкоза та крохмаль (0,70 і 0,77 г/дм³ біомаси, відповідно), для *S. commune* 1760 — глюкоза, гліцерин та манніт (1,54—1,63 г/дм³).

Кращими джерелами азоту (рис. 1, б) для *G. frondosa* виявилися нітрат амонію (1,28 г/дм³ біомаси), а для *S. commune*, крім NH_4NO_3 , — пептон, триптофан та лейцин. При цьому максимум біомаси спостерігали при культивуванні на середовищі з пептоном і триптофаном — 2,62 та 2,35 г/дм³, відповідно.

Для визначення біомаси та концентрації екзополісахаридів у динаміці штами *G. frondosa* 332 і *S. commune* 1760 культивували на середовищі з додаванням 2 % пивного суслу (рис. 2). Встановлено, що активна фаза росту припадає для них на 24—48 години культивування, а максимальне накопичення біомаси — відповідно, 5,69 та 7,32 г/дм³ — спостерігалося на четверту та п'яту добу. Найвища концентрація екзополісахаридів для *S. commune* становила 4,38 г/дм³ на третю добу, а для *G. frondosa* — 1,71 г/дм³ на п'яту добу культивування.

Оскільки комплексні середовища сприятливіші для росту та накопичення біологічно активних метаболітів з грибів і є відносно дешевими, то на наступному етапі досліджень визначали особливості біосинтетичної активності та накопичення біомаси для шести штамів на п'яти комплексних рідких середовищах. Виявлено, що найкращий ріст спостерігався в *S. commune* 1760 на середовищі з КЕ та мелясою — 6,7 та 8,8 г/дм³, відповідно, найгірший — на середовищі з глюкозою або з суслим (рис. 3).

У *G. frondosa* 332 найбільша кількість біомаси була на середовищах з КЕ та пептоном — 2,7 і 3,3 г/дм³, відповідно. Найгірший ріст штаму 332 відзначено на середовищі з суслим (0,2 г/дм³).

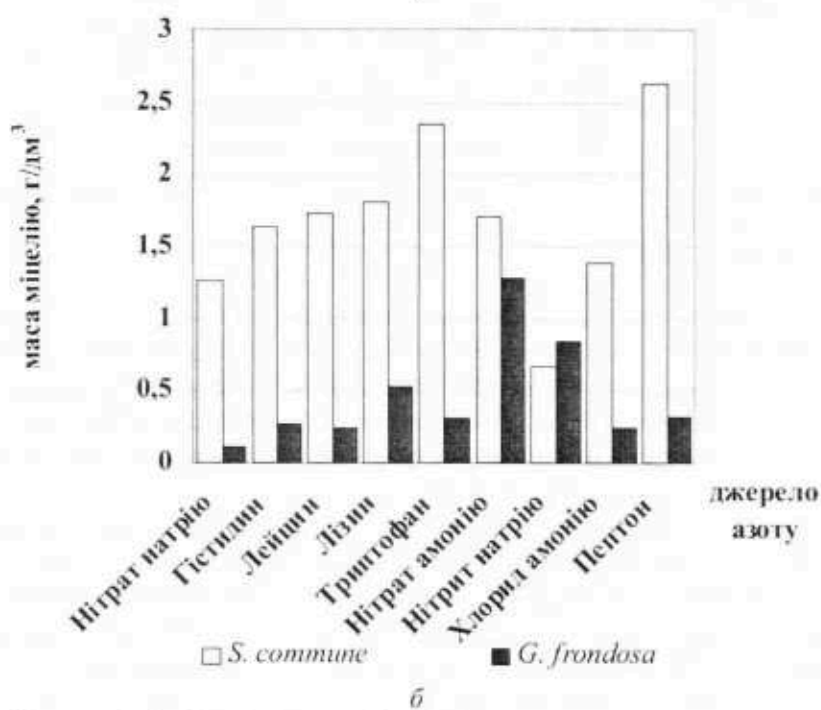
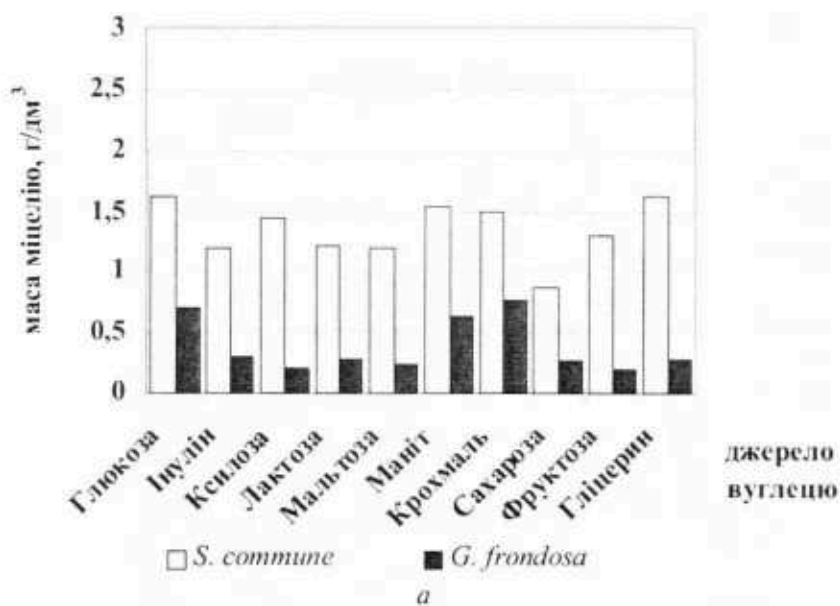


Рис. 1. Ріст штамів *Grifola frondosa* та *Schizophyllum commune* на середовищах з різними джерелами вуглецю (а) та азоту (б) (7 доба)

Fig. 1. Growth of strains *Grifola frondosa* and *Schizophyllum commune* on mediums with different sources of glucose (a) and nitrogen (б) (7 days)

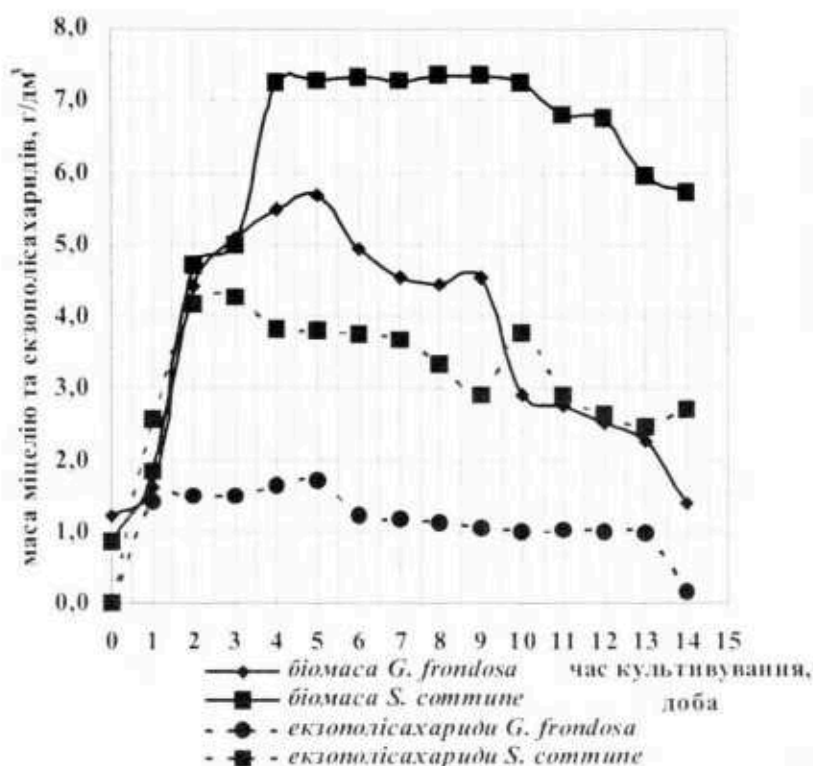


Рис. 2. Динаміка біомаси та екзополісахаридів у *G. frondosa* і *S. commune* у глибинній культурі.
 Fig. 2. The dynamic of biomass and exopolysaccharides for *G. frondosa* and *S. commune* in the submerged culture

Визначення накопичення екзополісахаридів на комплексних живильних середовищах (рис. 4) показало, що їх максимальна кількість була у штаму *S. commune* 1760 (8,30 г/дм³) на середовищі з кукурудзяним екстрактом, а у *G. frondosa* — на середовищах з м'ясою або пептоном (2,8 та 3,4 г/дм³). Найменшу активність щодо накопичення екзополісахаридів досліджувані штами виявляли на середовищах з глюкозою та суєлом.

У разі культивування на сприятливих для продукування біомаси та екзополісахаридів середовищах з КЕ та м'ясою також зафіксовано незначну зміну рН — у межах 4,67–5,01 — для *S. commune* 1760 і 5,56–5,28 — *G. frondosa* 332 та високий ступінь споживання редуруючих речовин (РР): 81 % — на м'ясі для *G. frondosa* 332 та 83 % — на середовищі з КЕ у *S. commune*.

Дослідження вмісту РР у культуральному фільтраті при культивуванні на комплексних живильних середовищах показало, що основними тенденціями динаміки споживання цих сполук є поступове зниження їх кількості в культуральній рідині для всіх штамів *S. commune* на всіх середовищах і для штамів *G. frondosa* на всіх середовищах, крім середовища пептонолу, на якому спочатку спостерігається підвищення кількості РР протягом перших трьох днів культивування. Нерівномірне зменшення концентрації РР у середовищі,

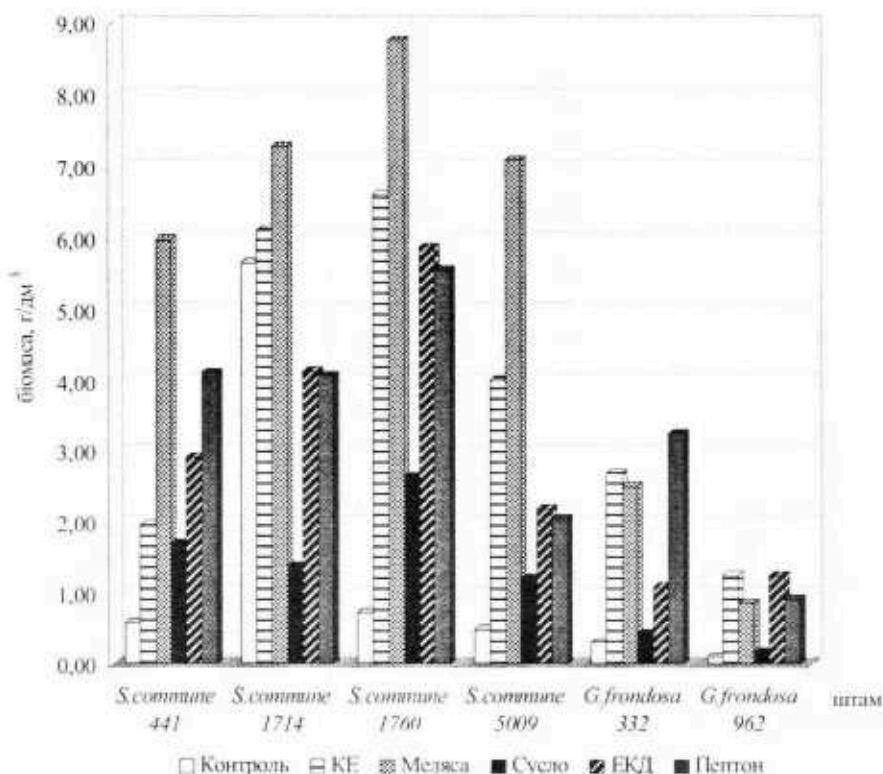


Рис. 3. Ріст штамів *G. frondosa* та *S. commune* на комплексних живильних середовищах (10-та доба)

Fig. 3. Growth of strains *G. frondosa* and *S. commune* on complex nutritional mediums (10 days)

тобто деяке тимчасове збільшення вмісту РР при культивуванні штамів *G. frondosa* і *S. commune*, пояснюється різним складом живильних середовищ і розкладанням їх компонентів у кілька етапів, причому вміст цукрів може зростати. Таке збільшення концентрації РР у культуральному середовищі корелює з підвищенням активності досліджених целюлолітичних ферментів: ендо-1,4- β -глюканазу для штамів *G. frondosa* та ендо-1,4- β -глюканазу та екзо-глюканазу — для *S. commune*. При цьому максимальна активність ендо-1,4- β -глюканазу спостерігалася в усіх штамів на середовищах з домішками рослинного походження (КЕ, м'яса, сусло) або з глюкозою і припадала на 2—3 і 9—11 доби культивування для *G. frondosa* чи поступово збільшувалася у штамів *S. commune*. Максимальне значення активності ендо-1,4- β -глюканазу становило 1223,5 $\mu\text{M}/\text{год} \cdot \text{см}^3$ у штаму 1760 *S. commune* на середовищі з КЕ (шоста доба культивування). КМЦ-активність у штамів була значно меншою, лише 17,5 $\mu\text{M}/\text{год} \cdot \text{см}^3$ на 10-ту добу також у середовищі з КЕ. Активність екзоглюканазу визначали тільки у штамів *S. commune*, максимальне її значення отримали також у штаму 1760 на середовищі з м'ясою на другу добу — 970 $\mu\text{M}/\text{год} \cdot \text{см}^3$.

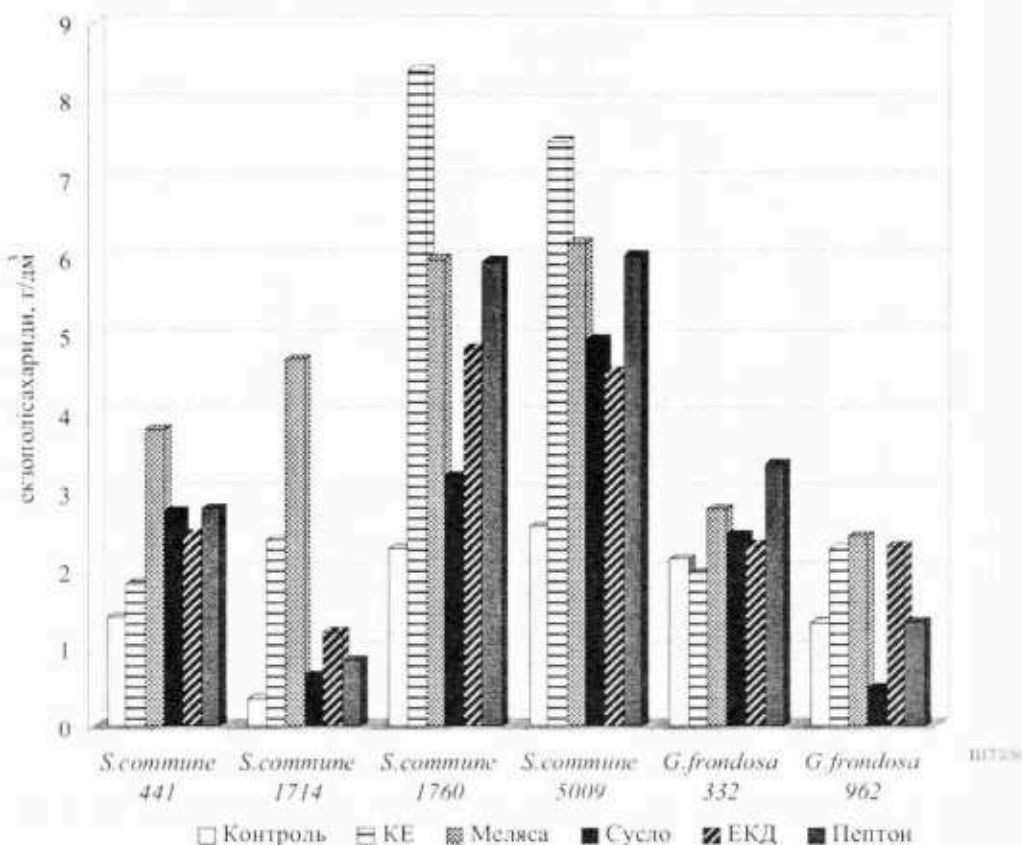


Рис. 4. Біосинтез екзополісахаридів штамми *G. frondosa* та *S. commune* на комплексних живильних середовищах (10-та доба)

Fig. 4. Biosynthesis of exopolysaccharides by strains *G. frondosa* and *S. commune* on complex nutritional mediums (10 days)

Одним з важливих показників фізіологічної активності культури, що характеризує як наявність екзоферментів, так і динаміку споживання компонентів живильного середовища, є вміст білка в культуральній рідині. На середовищах з додаванням компонентів, які містять білок (пептон та ЕКД), у більшості штамів спостерігалось зниження його концентрації протягом перших 2–4 діб. Водночас за наявності в середовищах домішок рослинного походження вміст білка в культуральній рідині переважно поступово збільшувався, а після 2–4 доби культивування — зменшувався. Тільки у штамів 5009 та 332 спостерігалось підвищення концентрації білка протягом перших 2–3 діб культивування на всіх досліджуваних середовищах, що, ймовірно, пов'язано з особливостями виділення в середовище екзоферментів.

Висновки

Досліджено ріст і біосинтетичну активність двох видів (шести штамів) лікарських вищих базидіальних грибів *Grifola frondosa* та *Schizophyllum commune* на комплексних середовищах різного складу.

Визначення динаміки накопичення біомаси та екзополісахаридів у *G. frondosa* 332 і *S. commune* 1760 показало, що максимум біомаси (5,69 та 7,32 г/дм³) припадає, відповідно, на п'яту та четверту доби культивування.

Найкращими для накопичення біомаси та екзополісахаридів для штаму *G. frondosa* 332 є джерела вуглецю — крохмаль, глюкоза, азоту — нітрат амонію, а для *S. commune* 1760 — глюкоза, гліцерин, манніт (джерела вуглецю) та нітрат амонію і пептон (джерела азоту).

Найвищий рівень накопичення екзополісахаридів виявлено у *G. frondosa* 332 (2,8–3,4 г/дм³ на середовищах з мелясою або пептоном) та *S. commune* 1760 (8,3 г/дм³ на середовищі з кукурудзяним екстрактом). При цьому максимум накопичення екзополісахаридів припадає на п'яту і третю доби росту, відповідно.

Встановлено незначну зміну рН на сприятливих для продукування біомаси та екзополісахаридів середовищах з кукурудзяним екстрактом і мелясою: у межах 4,67–5,01 для *S. commune* 1760 та 5,56–5,28 — *G. frondosa* 332, максимальну активність целюлолітичних ферментів на цих же середовищах та високий ступінь споживання редуруючих цукрів — 81 % на мелясі для *G. frondosa* 332 та 83 % — на середовищі з КЕ у *S. commune*.

Для подальших мікологічних та біотехнологічних досліджень обрано штами-продуценти *G. frondosa* 332 та *S. commune* 1760, що мають досить високий рівень накопичення екзополісахаридів і біомаси, запропоновано сприятливі для цього комплексні живильні середовища з КЕ і мелясою.

1. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. — Киев: Наук. думка, 1988. — 144 с.
2. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. — Киев: Наук. думка, 1983. — 189 с.
3. Литовицька В.М., Бухало А.С. Дослідження культур лікарського гриба *Grifola frondosa* (Dick: Fr.) S.F. Gray (Basidiomycetes, Polyporaceae) на агаризованих поживних середовищах // Укр. ботан. журн. — 2004. — 61, №2. — С. 41–48.
4. Литовицька В.М., Бухало А.С. Культуральні та морфологічні особливості лікарського гриба *Schizophyllum commune* Fr. (Basidiomycetes) на агаризованих живильних середовищах // Укр. ботан. журн. — 2005. — 62, № 1. — С. 78–86.
5. Методы экспериментальной микологии. Справочник / Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. — Киев: Наук. думка, 1982. — 561 с.
6. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии // Медицина и физкультура. — София, 1968. — 230 с.
7. Hobbs C. Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture. — Santa Cruz: Botanica Press, 2005. — 251 p.
8. Hobbs C. The chemistry, nutritional value, immunopharmacology and safety of the traditional food of Medicinal split-gill fungus *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (*Schizophyllum* spp.). A literature review // Int. J. Med. Mushr. — 2005. — 7. — P. 127–139.
9. Smith J.E., Sullivan R., Rowan N. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: current perspectives (review) // Int. J. Med. Mushr. — 2003. — 5. — P. 217–234.
10. Wasser S.P., Sytnik K.M., Buchalo A.S., Solomko E.F. Medicinal mushrooms: past, present and future // Ukr. Bot. Journ. — 2002. — 59, № 5. — P. 499–524.

11. Zhuang C., Wasser S.P. Medicinal value of culinary-medicinal maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Aphyllphoromycetideae): Review. // Int. J. Med. Mushr. — 2004. — 6. — P. 287—313.

Рекомендує до друку

Надійшла 28.05.2007

I.O. Дудка

В.М. Линовицька¹, А.С. Бухало²

¹ Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»

² Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

РОСТ И БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *GRIFOLA FRONDOSA* (DICKS: FR.) S.F. GRAY И *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (BASIDIOMYCOTA) В ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЕ

Представлены результаты исследования роста и биосинтетической активности съедобных лекарственных высших базидиомицетов *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray и *Schizophyllum commune* Fr. из коллекции шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины в условиях глубинного культивирования.

Установлено, что для продукции биомассы лучшими источниками азота являются NH_4NO_3 и пептон, а углерода — глюкоза.

Для дальнейших микологических и биотехнологических исследований отобраны перспективные штаммы с высоким уровнем биосинтетической активности: *G. frondosa* 332 и *S. commune* 1760. Для получения биомассы и экзополисахаридов рекомендованы комплексные питательные среды с пептоном либо мяясой и кукурузным экстрактом для *G. frondosa* 332 и *S. commune* 1760, соответственно.

Ключевые слова: *Grifola frondosa*, *Schizophyllum commune*, глубинное культивирования, биомасса, экзополисахариды, комплексные питательные среды, целлюлолитические ферменты.

V.M. Linovytska¹, A.S. Buchalo²

¹ National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnical Institute», Faculty of Biotechnology and Biotechnique, Chair of Industrial Biotechnology

² M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

GROWTH AND BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF *GRIFOLA FRONDOSA* (DICKS: FR.) S.F. GRAY AND *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (BASIDIOMYCOTA) IN THE SUBMERGED CULTURE

The growth and biosynthetic activity of edible, medicinal mushrooms *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray and *Schizophyllum commune* Fr. from the Collection of Fungal Cultures of the M.G. Kholodny Institute of Botany NASU (Kyiv) were investigated under submerged cultivation. The most favorable for the biomass production of the investigated strains were NH_4NO_3 and peptone as sources of nitrogen, and glucose as a source of carbon.

Strains *G. frondosa* 332 and *S. commune* 1760 with high levels of biosynthetic activities were selected for following investigation as the biotechnological application.

For biomass and exopolysaccharides production, nutritional complex mediums with peptone or molasses and with corn extract were selected for strains *G. frondosa* 332 and *S. commune* 1760, accordingly.

Key words: *Grifola frondosa*, *Schizophyllum commune*, submerged culture, biomass, exopolysaccharides, complex nutritional mediums, cellulolytic enzymes.