



УДК 582.284+57.083.132: 579.24

О.В. Чайка, О.В. Федотов

**КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
КСИЛОТРОФНИХ БАЗИДИОМІЦЕТІВ У ГЛИБИННІЙ КУЛЬТУРІ***Донецький національний університет**e-mail: bio.graff@yandex.ua*

Робота присвячена дослідженню особливостей росту 79 штамів 18 видів ксилотрофних базидіоміцетів при глибинному культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі. Більшість штамів (85%) була виділена в чисту культуру з дикоростучих базидіом, зібраних в різних місцевостях м. Донецька й області. Вивчали макро- та мікроскопічну будову пелетів, визначали зміну рН культурального фільтрату потенціометричним методом та абсолютно суху біомасу ваговим методом і розраховували приріст біомаси та питому швидкість росту. Отримані результати дозволили встановити видову і штамову специфічність культурально-морфологічних характеристик досліджених базидіоміцетів. На основі виконаних досліджень адаптовано спосіб глибинного культивування вищих базидіоміцетів, що дозволяє значно скоротити термін їх ферментації. Виявлені особливості росту, які можуть бути використані при подальших дослідженнях біосинтетичної активності глибинних культур ксилотрофних базидіоміцетів.

Ключові слова: ксилотрофні базидіоміцети, глибинне культивування, ростові і морфологічні ознаки

А.В. Чайка, О.В. Федотов

**КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЕ***Донецкий национальный университет**e-mail: bio.graff@yandex.ua*

Работа посвящена исследованию особенностей роста 79 штаммов 18 видов ксилотрофных базидиомицетов при глубинном культивировании на глюкозо-пептонной среде. Большинство штаммов (85%) было выделено в чистую культуру из дикорастущих базидиом, собранных в различных местностях г. Донецка и области. Изучали макро- и микроскопическое строение пеллет, определяли рН культурального фильтрата потенциометрическим методом, а также абсолютно сухую биомассу весовым методом и рассчитывали прирост биомассы и удельную скорость роста. Полученные результаты позволили установить видовую и штаммовую специфичность культурально-морфологических характеристик исследованных базидиомицетов. На основе выполненных исследований оптимизирован способ глубинного культивирования высших базидиомицетов, что позволяет значительно сократить срок

ферментации. Выявлены особенности роста, которые могут быть использованы при дальнейших исследованиях биосинтетической активности глубоководных культур ксилотрофных базидиомицетов.

Ключевые слова: ксилотрофные базидиомицеты, глубинное культивирование, ростовые и морфологические признаки

Chaika A.V., Fedotov O.V.

**CULTURAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE
XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES IN SUBMERGED CULTURE**

Donetsk National University

e-mail: bio.graff@yandex.ua

The aim of the present study was to evaluate the growth specificities of 79 strains of 18 species xylotrophic basidiomycetes under submerged fermentation on glucose-peptone medium. Most of the strains (85%) were isolated from the fruiting bodies collected in different localities of Donetsk and its region. The macro- and microscopic structure of pellets was studied, pH of the culture filtrate was determined by potentiometric method, oven-dry biomass was determined by weighing method and biomass increase and specific growth rate were calculated. The results obtained allowed to ascertain the strain and species character of culture-morphological characteristics of the studied basidiomycetes. On the basis of the research the higher basidiomycetes submerged cultivation method was optimized making the period of fermentation significantly reduced. The growth peculiarities revealed can be used for further studies of biosynthetic activity of the xylotrophic basidiomycetes submerged cultures.

Key words: xylotrophic basidiomycetes, submerged fermentation, growth and morphological characteristics

На перших етапах залучення до біотехнологій, базидіомицети розглядалися лише як об'єкти для отримання білку. Це спонукало дослідників до вивчення способів їх культивування та особливостей метаболічних процесів. Останнім часом, культури базидіомицетів стали розглядатися і як перспективні продуценти біологічно активних речовин (БАР) широкого спектру дії. У цій області гриби виявилися настільки затребуваними, що з'явився новий напрям медицини – фармакологічна мікологія (Феофилова, 2007; Lee, 2004). Так, на основі базидіомицетів створено унікальні лікарські та профілактичні препарати, зокрема: шизофілан, грифолан, лентинан, коріолан тощо (Феофилова, 2007; Wasser, 2002; Lindequist, 2005; Бадалян, 2000)

Задля отримання комерційних плодівих тіл, міцеліальної біомаси та метаболітів, розроблено численні способи культивування базидіомицетів на твердих субстратах чи рідких живильних середовищах поверхневим або глибинним методами (Феофилова, 2007; Бухало, 1988; Соломко, 1985; Wagner,



2003). Дослідження показали, що за вмістом найважливіших БАР, в т.ч. антиоксидантів, глибинний міцелій не поступається плодовим тілам, а за накопиченням білків, ліпідів, полісахаридів, каротиноїдів тощо перевищує їх (Феофилова, 2007; Ліновицька, 2011; Уфимцева, 2009; Бабицкая, 2006; Щерба, 2004). Глибинне культивування має ряд переваг в порівнянні з поверхневим: може бути економічно більш вигідним, надає можливість масштабування біотехнологічного процесу та керування ним. Міцеліальна культура розвивається в однакових повністю контрольованих умовах, що забезпечують фізіологічні потреби гриба. Крім того, аерація і механічне перемішування середовища, яке значно прискорює дифузію речовин, сприяють максимальному росту міцелію і накопиченню продуктів метаболізму. Стає можливим абсолютне дотримання стерильності на всіх етапах ферментаційного процесу. Все це дозволяє скоротити тривалість процесу, підвищити вихід продукту з сировини та отримувати однорідну стандартизовану продукцію високої якості із заданими властивостями, що гарантує ефективність та безпечність одержуваних препаратів цільового призначення (Феофилова, 2007; Бабицкая, 2006; Винаров, 2005; Kim, 2002; Garibova, 2003). Отже, в сучасній біотехнології більш перспективною вважається технологія глибинного культивування базидіоміцетів.

Дереворуйнівні базидіоміцети – лігнотрофи є еволюційно найбільш молодю еколого-трофічною групою грибів, що пристосувалися до утилізації складного лігноцелюлозного комплексу деревини переважно листяних порід. Як наслідок, ці гриби мають добре розвинуті ферментативний комплекс та прооксидантно-антиоксидантну систему, а отже є перспективними об'єктами біотехнології (Гарибова, 2005; Чайка, 2011; Федотов, 2012).

На кафедрі фізіології рослин біологічного факультету Донецького національного університету для дослідження прооксидантно-антиоксидантної системи грибів, створено колекцію культур базидіальних грибів (відділ *Basidiomycota*), яка налічує понад 125 штамів. Скринінгові дослідження цих штамів при поверхневому культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі дозволили рекомендувати деякі з них для використання в якості продуцентів оксидоредуктаз, пігментів та антиоксидантів (Федотов, 2012). Наступним етапом досліджень було вивчення фізіолого-біохімічних особливостей росту цих штамів при глибинному культивуванні.

Метою роботи було вивчення особливостей росту ксилотрофних базидіоміцетів при глибинному культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом дослідження були міцелій та культуральний фільтрат 79 штамів 18 видів ксилотрофів з колекції культур базидіоміцетів кафедри

фізіології рослин Донецького національного університету (Федотов, 2012). Серед досліджених штамів, 60 належать до 8 видів порядку *Agaricales: Agrocybe cylindracea* (DC.) Maire – 167, 218, 960, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – Le-2, Le-340, Le-4, Le-6, Le-7, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer – F-03, F-06, F-073, F-1, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-610, F-vv, F-10, F-11, F-1105, *Fistulina hepatica* (Schaeff.) With. – Fh-08, Fh-09, Fh-18, *Schizophyllum commune* Fr. – Sc-10 Sc-1102 Sc-1104, *Pleurotus citrinopileatus* Singer – P-citr, *Pleurotus eryngii* (DC.) Quéf. – P-er, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. – D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-208, P-6v, P-91, P-94, P-998, HY-35, P-089, P-105, P-107, P-12к, P-191, P-203, P-206, P-209, P-210, P-4к, P-кл, а 19 – до 10 видів порядку *Polyporales: Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. – Gl-1, Gl-2, Gl-3, Gl-B-99, Gl-11, *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. – IL-4K, IL-1, IL-1201, *Fomes fomentarius* (L.) Fr. – Ff-09, T-10, Ff-1201, *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd – Th-11, *Trametes ochracea* (Pers.) Gilb. & Ryvarden – To, *Trametes trogii* Berk. – Tt-11, *Trichaptum bifforme* (Fr.) Ryvarden – Tb-11, *Daedalea quercina* (L.) Pers. – Dq-08, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray – Gf-01, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill – Ls-08, Ls-09. Переважна більшість штамів була виділена в чисту культуру за загальноприйнятим методом (Бухало, 1988; Федотов, 2012) з дикоростучих базидіом, зібраних в різних місцевостях м. Донецька й області. З Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІВК) для досліджень отримано 5 штамів: 167, 218, 960, Le-340, F-610; а з комерційних організацій «УкрМіцелій» та «Біотехнологія» – 7: Le-2, Le-4, Le-6, Le-7, P-citr, P-er, Hk-35. Чисті міцеліальні культури підтримуються на агаризованому незахміленому пивному суслі (4° за Баллінгом) при температурі +20±5°C шляхом пересівів кожні 5-6 місяців.

З метою проведення досліджень штами культивували глибинним методом на стандартному глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) наступного складу (г/л): глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 0,6; K_2HPO_4 – 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, співвідношення C:N дорівнювало 13:1. Початковий рівень рН середовища складав 6,6±0,1. Культивування проводили при 25±1°C – температурному оптимумі росту більшості штамів (Дудка, 1982). Для досліджень використовували міцелій та культуральний фільтрат. Наприкінці терміну ферментації міцелій відділяли від культуральної рідини за допомогою щільної капронової тканини, отримуючи таким чином культуральний фільтрат (КФ). Водневий показник КФ визначали потенціометричним методом на рН-метрі „рН-150 МИ”. Міцелій тричі промивали дистильованою водою, підсушували фільтрувальним папером та визначали абсолютно суху біомасу (АСБ) ваговим методом (Дудка, 1982), г/л.

Розраховували інтегральне значення питомої швидкості росту культур базидіоміцетів μ (доба⁻¹) за формулою (Дудчик, 2009):



$$\mu = \frac{(\ln m_1 - \ln m_0)}{t_1 - t_0},$$

де m_0 та m_1 – початкова та кінцева концентрація абсолютно сухої маси (г) в початковий (t_0) та кінцевий момент часу (t_1), відповідно. Приріст біомаси визначали як різницю між кінцевим та початковим значеннями АСБ.

Досліди проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані обробляли з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки результатів біологічних експериментів (Приседський, 2005).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Процес оптимізації глибинного культивування досліджуваних штамів ксилотрофних базидіоміцетів складався з серії дослідів, в яких вирішувалось завдання отримання гомогенного інокулюму та встановлення його дозування на певний об'єм живильного середовища з метою подальшого їх вирощування.

Культивування штамів проводили в дві стадії. На першій стадії отримували чистий гомогенізований інокулюм. Для цього випробували різні модифікації отримання інокулюму, зокрема на агаризованих середовищах (СА, КГА (Бухало, 1988)), при поверхневому та глибинному культивуванні на ГПС в колбах та пробірках без гомогенізації і з наступною гомогенізацією шляхом асептичного розтирання міцелію (неопубліковані дані).

За результатами цих досліджень було обрано як найбільш технологічно придатний наступний спосіб отримання інокулюму. Колби зі спеціальними шипоподібними відбійниками, ємністю 250 мл з 50 мл ГПС засівали міцелієм 5×5 мм робочих культур. Колби розміщали на лабораторній мішалці АБУ-6С зі зворотньо-поступальним рухом з режимом 45 хв. роботи з частотою 120 коливань за хв. та 15 хв. – інтервал. Міцелій в такому режимі досягає оптимальних параметрів (невеликі фрагменти у експоненційній фазі росту, близька до максимальної біомаса), для пересіву на 7-му добу культивування.

Перед пересівом визначали АСБ та проводили контроль чистоти інокулюму. Пробу культуральної рідини асептично вилучали з колби, готували мікропрепарат і досліджували при збільшенні 16×100 за допомогою світлового мікроскопу XS-5520 MICROmed. Розглядали септований міцелій та виявляли пряжки, характерні для базидіоміцетів (Бухало, 1988; Гарібова, 2005); констатували відсутність бактеріальних клітин (рис. 1.).

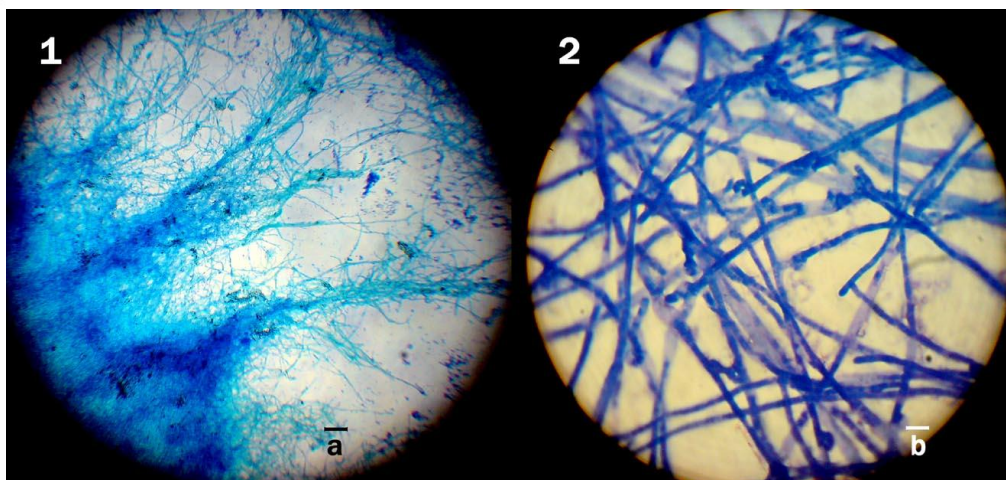


Рис. 1. Мікрофотографія краю пелету (1) та міцелію глибинної культури (2) штаму *T. hirsuta* Th-11. Масштабні риски: а – 100 нм, б – 10 нм.

Fig. 1. Photomicrograph of pellet's edge (1) and deep culture mycelium (2) of strain *T. hirsuta* Th-11. Scale risks: a – 100 nm, b – 10 nm.

З метою встановлення впливу дозування посівної культури та об'єму живильного середовища на ефективність основної стадії культивування, використовували 20, 30, ... 100 мл ГПС на колбу (рис. 2.) та вносили інокулюм в кількості 1; 3; 5; 7,5; 10; 12,5 та 15% за об'ємом (рис. 3.). Для цього була взята обмежена кількість штамів з найбільш чисельних груп – видів *F. velutipes* та *P. ostreatus*, а також по одному штаму видів *A. cylindracea*, *L. edodes* та *P. eryngii*. Отримані результати показують, що для досліджених штамів спостерігається тенденція зростання показника приросту біомаси зі збільшенням вмісту ГПС в колбі. Це, скоріш за все, пов'язано з вмістом лімітуючих компонентів у середовищі, тобто з ростом об'єму середовища збільшується і вміст лімітуючих компонентів, що забезпечує тривалість росту міцелію в експоненціальній фазі. Причому, вже при об'ємі в 50 мл ГПС спостерігається поступове уповільнення цієї залежності. При вивченні залежності приросту біомаси від кількості посівного матеріалу (об'ємні %, V/V) спостерігається тенденція, подібна до описаної щодо залежності приросту біомаси від кількості живильного середовища. Як оптимальне, для подальших дослідів було прийняте дозування 10% інокулюму на 50 мл середовища.

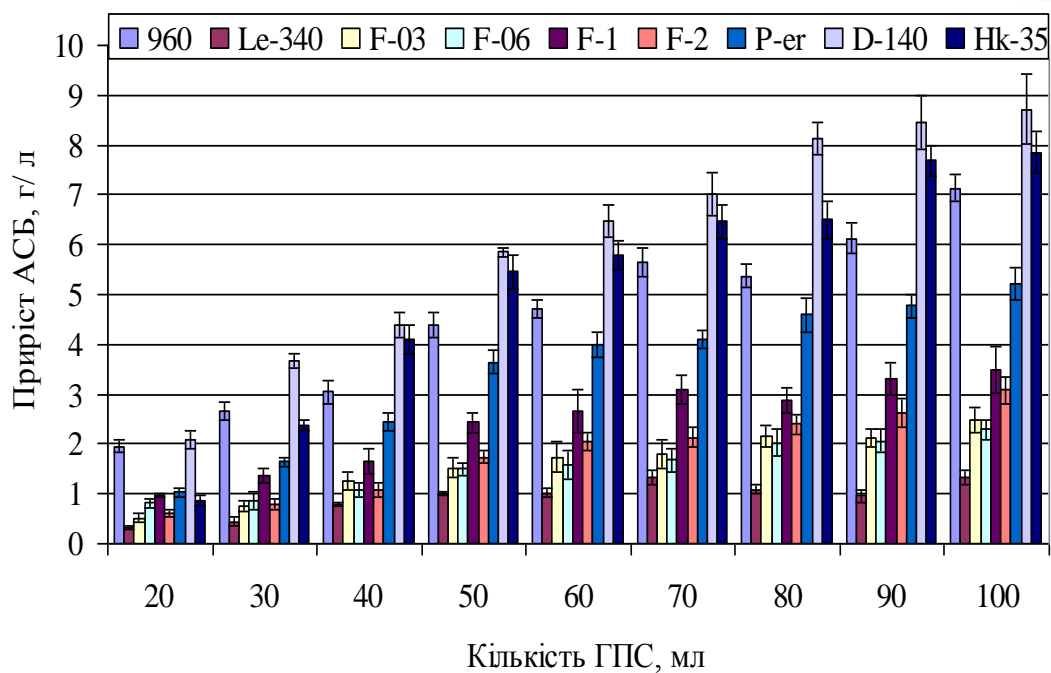


Рис. 2. Приріст біомаси деяких штамів в залежності від кількості живильного середовища.

Fig. 2. The biomass increase of some strains depending on the amount of nutrient medium.

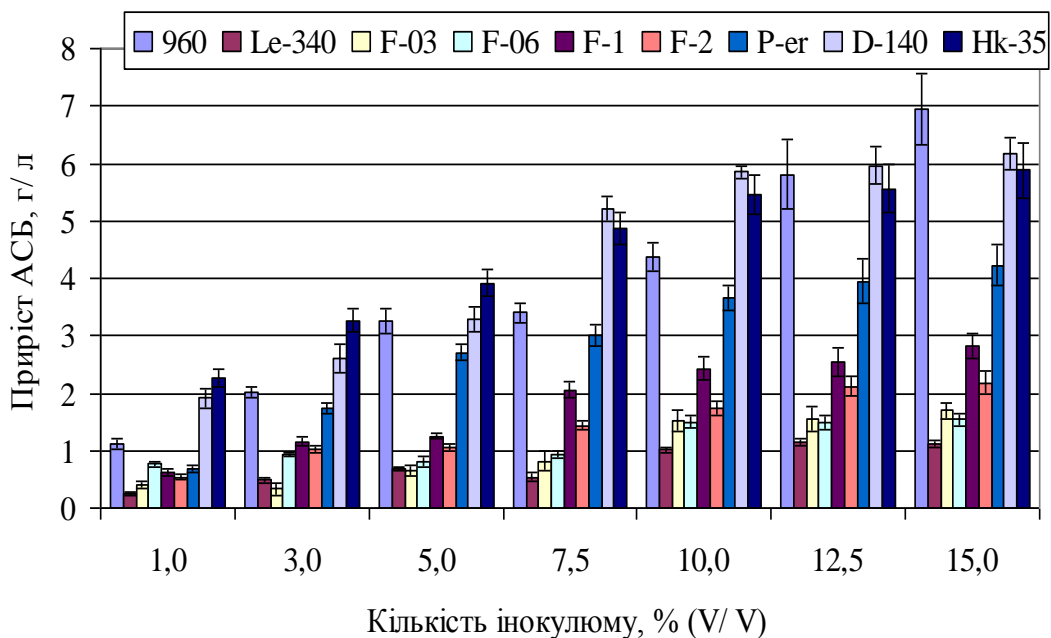


Рис. 3. Приріст біомаси деяких штамів в залежності від кількості посівного

матеріалу.

Fig. 3. The biomass increase of some strains depending on the amount of inoculum.

Експериментально встановлено, що і на основній стадії культивування найбільш оптимальним є режим 45 хв. роботи лабораторної качалки зі зворотно-поступальним рухом із частотою 120 коливань за хв. з 15 хв. інтервалом.

З метою встановлення характеру росту і тривалості ростових фаз культур базидіоміцетів в заданих умовах культивування та визначення оптимального строку основної стадії ферментації, було встановлено динаміку накопичення біомаси штамми (неопубліковані дані). Результати дозволили визначити оптимальний строк культивування – 6 діб, коли культури знаходяться в логарифмічній стадії росту. Однак, для трьох штамів (*G. frondosa* Gf-01, *L. sulphureus* Ls-08 та Ls-09) цей термін подвоювався через повільну швидкість ростових процесів. Отже, використання описаної технології (Патент 74241 UA) дозволяє значно скоротити термін ферментації, порівняно з використанням в якості інокулуму поверхневого міцелію, оскільки культура є вже пристосованою до умов глибинного культивування і має значну кількість новоутворених фрагментів однакової маси в активній фазі росту.

Під час ферментації досліджувані штами утворювали різного розміру пелети (*pellets*) – стабільні більш-менш щільні сферичні агрегати, що складаються з розгалужених переплетених гіф (рис. 4.). Окрім пелетів, в деяких випадках, в незначній кількості траплялися також вільні філаменти та невеликі шматочки міцелію неправильної форми.



Рис. 4. Глибинні культури у віці 6-ти діб штамів *P. eryngii* P-er (1) і *T. hirsuta* Th-11 (2) в порівнянні з поверхневою – *T. hirsuta* Th-11 (3).

Fig. 4. Submerged 6-day cultures of *P. eryngii* P-er (1) and *T. hirsuta* Th-11 (2) strains compared with the surface culture of *T. hirsuta* Th-11 (3).



Надаємо ряд культурально-морфологічних характеристик досліджених штамів ксилотрофних базидіоміцетів. Штами *A. cylindracea* росли у вигляді гладеньких сферичних, чи дещо видовжених пелетів діаметром 2-5 мм майже білого кольору. Штами *L. edodes* утворювали пелети, схожі за морфологією на *A. cylindracea*, але менші за розміром (1-2 мм). Для штамів *F. velutipes* характерні пелети діаметром 1-7 мм круглі білого та жовтуватого кольору гладенькі, або з радіальними міцеліальними тяжами різного розміру, розташованими по краю. Штами *F. hepatica* забарвлювали КФ в жовтувато-зеленуватий колір (особливо інтенсивно – штам Fh-18) та утворювали так само забарвлені сферичні пелети діаметром 3-5 мм, у яких по краю відходять невеликі радіальні міцеліальні тяжі. Представники *S. commune* утворювали сферичні та видовжені діаметром 2-4 мм білі гладенькі пелети, які були слизькі на дотик, а культуральна рідина мала в'язку консистенцію через наявність значної кількості екзополісахаридів та білків, що підтверджується дослідженнями (Wasser, 2002; Lindequist, 2005; Бадалян, 2000). Штам *P. citrinopileatus* P-citr ріс у вигляді дрібних, до 1-2 мм у діаметрі, жовтуватих гладеньких пелетів сферичної форми, а штам *P. eryngii* P-er – сферичних, овальних та неправильної форми, різних за розміром, від 3 до 7 мм, білих гладеньких гранул. Штами *P. ostreatus* утворювали круглі та видовжені діаметром 3-7 мм гладенькі пелети, іноді з невеликими міцеліальними тяжами, білого кольору. Штами *G. lucidum* формували сферичні гладенькі білі пелети діаметром 2-3 мм. Для *I. lacteus* наявні білувато-жовтуваті, різної форми діаметром 1-2 мм утворення та дрібні вільні філаменти у великій кількості, що утворювали стійку зависть. Представники *F. fomentarius* забарвлювали КФ у світлий золотисто-бурий колір, утворювали круглі пелети розміром 3-4 мм золотисто-жовтуватого кольору. Штам *T. hirsuta* Th-11 ріс у вигляді пелетів діаметром 4-9 мм з численними радіальними міцеліальними тяжами, жовтувато-білого кольору. Штами *T. ochracea* T.o. та *T. trogii* Tt-11 утворювали білі діаметром 3-4 мм кулясті з гладенькою поверхнею пелети. Культура *T. biforme* Tb-11 має білі гладенькі неправильної форми пелети діаметром 2-4 мм, слизькі на дотик, що нагадує *S. commune*, але в останнього ця ознака сильніше виражена. Штам *D. quercina* Dq-08 ріс у вигляді гладеньких сферичних пелетів білого кольору діаметром до 7 мм. Штам *G. frondosa* Gf-01 характеризується овальними та неправильної форми жовтуватими пелетами діаметром 1-3 мм. Пелети штамів *L. sulphureus* мали вигляд дрібних овальних жовтуватих гладеньких гранул діаметром близько 1 мм, з деякою кількістю маленьких шматочків міцелію неправильної форми в культуральній рідині.

Різна морфологія глибинного міцелію досліджених штамів може бути наслідком їх генетичної розмаїтості та мінливості, що проявляється в різному характері та швидкості росту, інтенсивності галуження гіфів, утворенні анастомозів і позначається на міцності пелетів. Також, на характер росту

глибинних культур, мають вплив співвідношення об'єму живильного середовища та інокулуму, ступінь подрібненості останнього та термін ферментації. Як правило, невеликі за розміром пелети мали однорідну щільну структуру, наприклад, це характерно для видів *L. edodes*, *P. citrinopileatus*. Середні за розміром пелети з більш щільним центром та рихлим зовнішнім шаром характерні для видів *F. velutipes*, *F. hepatica*, *F. fomentarius*. Великі за розміром пелети з щільним зовнішнім шаром та рихлим центром, що лізувався, спостерігали у деяких штамів *P. ostreatus*. Це може бути пов'язане зі зміною умов доступу кисню та поживних речовин до поверхневих та глибинних шарів пелетів і вивільнення продуктів метаболізму в культуральне середовище під час їх росту.

Ростові показники досліджуваних штамів – приріст біомаси та питома швидкість росту представлені на рис. 5.

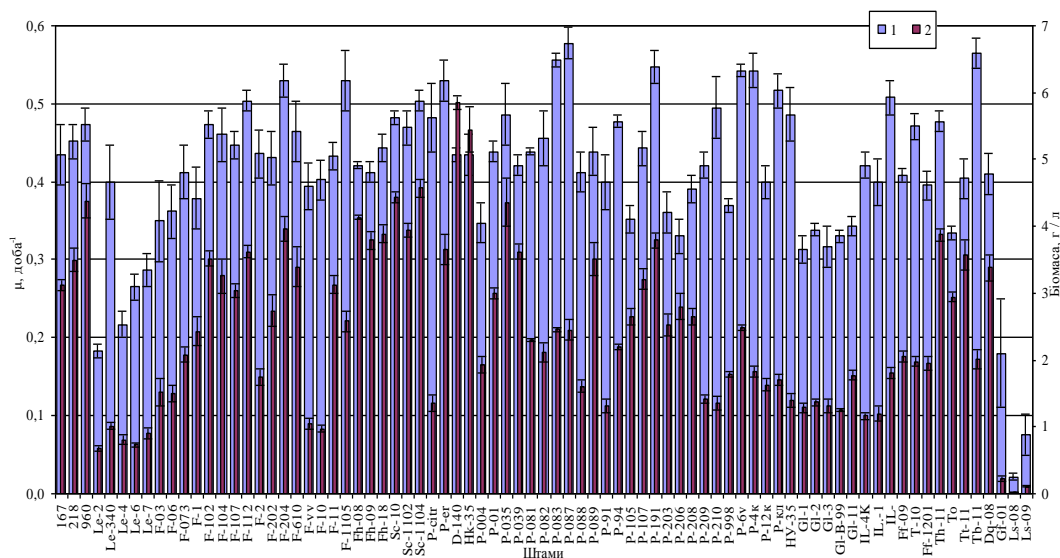


Рис. 5. Питома швидкість росту (1) та приріст біомаси (2) штамів базидіальних грибів.

Fig. 5. Specific growth rate (1) and biomass production (2) of basidiomycetes strains.

Наприкінці терміну глибинного культивування отримані наступні значення приросту біомаси досліджуваними штамми.

Найбільший приріст біомаси серед 8 видів порядку *Agaricales* встановлений для *S. commune*: середнє видове значення 4,31 г/ л, максимальне – у свіжовиділеного штаму Sc-1104 – 4,57 г/ л. Також високі показники приросту біомаси встановлені для *A. cylindracea*: середнє видове – 3,67, максимальне – 4,38 г/ л (шт. 960); для *F. hepatica* – 3,94, максимальне – 4,13 (шт. Fh-09) та для штаму



P. eryngii P-er – 3,88 г/ л. Найнижчі значення приросту біомаси зафіксовані для штамів виду *L. edodes* – середнє видове значення 0,83 г/л, та для штаму *P. citrinopileatus* P-citr – 1,36 г/ л. Приріст біомаси 28 штамів виду *P. ostreatus* коливався в широких межах: від мінімального 1,31 г/ л (шт. P-91) до 5,85 г/ л (шт. D-140), середнє значення для цього виду становить 2,62 г/ л. Приріст біомаси 16 культур *F. velutipes* мав середнє значення 2,53 г/ л з максимальним – 3,96 г/ л у шт. F-204, а мінімальним – 0,97 г/ л у шт. F-10.

Серед 10 видів порядку *Polyporales* найбільші значення приросту біомаси були у свіжовиділених штамів роду *Trametes*: *T. trogii* Tt-11 – 3,57 г/ л та *T. hirsuta* Th-11 – 3,17 г/ л. Не поступався ним і штаму *D. quercina* Dq-08 – 3,38 г/ л. Найнижчі ж значення приросту біомаси зафіксовані для штамів виду *L. sulphureus* – 0,07 г/ л, та *G. frondosa* Gf-01 – 0,23 г/ л.

Щодо питомої швидкості росту, то найвище значення цього показника серед видів порядку *Agaricales*, як і накопичення біомаси, встановлено у *S. commune*. Середньо видовий рівень тут склав 0,48 доба⁻¹; а максимальний у 0,50 доба⁻¹ – для штаму Sc-1104. Це вказує на високу активність і гнучкість ферментного апарату даного виду. Штаму *P. ostreatus* P-087 мав найвищу питому швидкість росту серед штамів агарикальних грибів – 0,58 доба⁻¹, але середнє її значення для цього виду становило 0,45 доба⁻¹. Найнижча питома швидкість росту серед видів цього порядку була встановлена для *L. edodes* з середньо видовим значенням 0,27 доба⁻¹. Особливу увагу привертає штаму *P. citrinopileatus* P-citr з високим значенням питомої швидкості росту 0,48 доба⁻¹ на фоні незначного приросту біомаси (рис. 5.). Це можна пояснити повільною активацією ферментативних систем цієї культури при пересіві на дане живильне середовище, що зумовлює тривалу лаг-фазу, особливо на першій стадії культивування і, як наслідок, низьку густину інокулюму. Це припущення підтверджує мале значення концентрації біомаси після інокуляції, яке становить 0,08 г/ л проти середнього 0,21 г/ л досліджуваних штамів. Те саме можна припустити відносно інших культур, які мали високу питому швидкість росту, та разом з тим, низькі показники приросту біомаси, наприклад, штами *F. velutipes* F-10, F-vv, *P. ostreatus* P-210. Інша закономірність спостерігається для штамів D-140 та Hk-35 *P. ostreatus*, які характеризуються дуже високими показниками приросту біомаси (5,85 та 5,45 г/л, відповідно) та не надто високою, близькою до середньо видової, питомою швидкістю росту у 0,43 доба⁻¹. В цьому випадку культури швидко адаптуються до нових умов, інтенсивно ростуть, та вже наприкінці стадії отримання інокулюму мають значний приріст біомаси і після пересіву значення концентрації біомаси становить 0,48 та 0,43 г/л, відповідно. Під час ферментації вони швидко виснажують середовище, утворюючи продукти обміну, та, накопивши значну масу, переходять до уповільнення та стаціонарної фаз розвитку. Можемо припустити, що

лімітувати швидкість росту може також зменшення парціального тиску кисню в середовищі через високий вміст біомаси та активне дихання культури, яке не може бути нівельоване наявною інтенсивністю перемішування.

Разом з перерахованими показниками, реєстрували зміну рН культуральної рідини досліджуваних штамів наприкінці ферментації та порівнювали їх з вихідним рівнем рН₀ ГПС (контроль). Ці дані представлені на рис. 6.

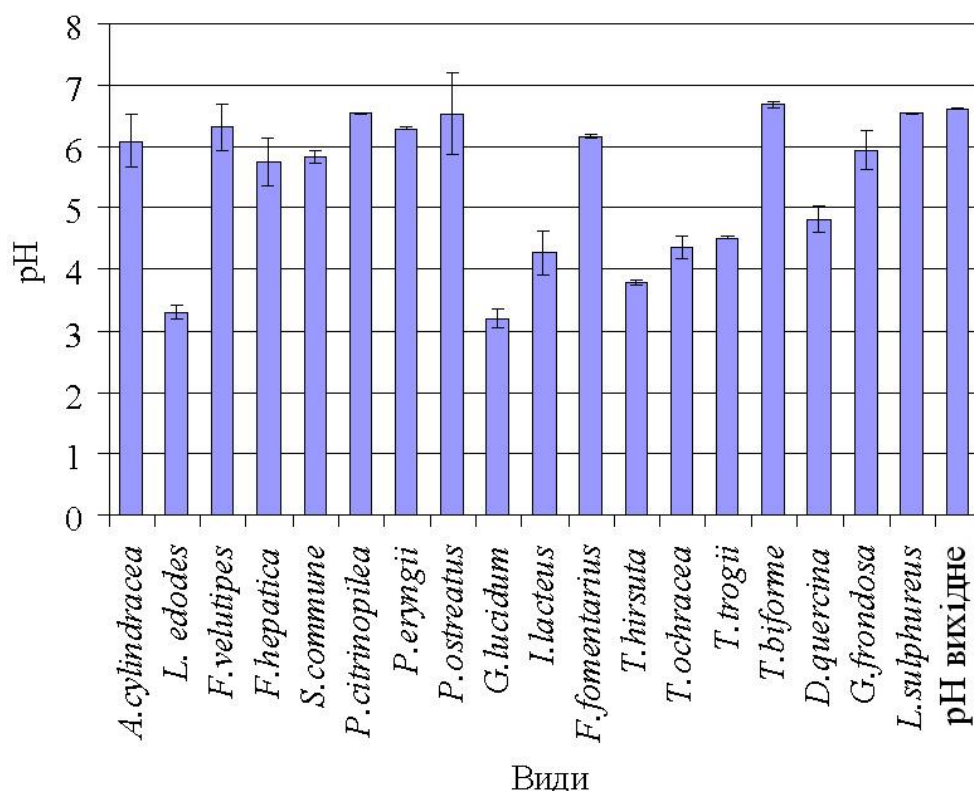


Рис. 6. Водневий показник культурального фільтрату деяких видів базидіоміцетів наприкінці ферментації на ГПС у порівнянні з вихідним.

Fig. 6. Hydrogen index of some basidiomycetes culture filtrate at the end of fermentation compared with the initial medium pH.

Як видно з графіку, переважна більшість видів досліджених базидіоміцетів при культивуванні на ГПС змінюють рН живильного середовища. Для більшості штамів водневий показник середовища знижувався, а для деяких штамів *F. velutipes* (F-06, F-073, F-2) та *P. ostreatus* (P-087, P-088, та P-94) – незначно підвищувався. Достовірно встановлено, що штами *P. ostreatus* з високими показниками приросту біомаси мають низькі значення рН КФ, коефіцієнт кореляції (r) цих величин дорівнює $-0,81 \pm 0,07$. Для штамів *F. velutipes* існує



аналогічна залежність з $r = -0,69 \pm 0,13$.

Внаслідок поглинання кисню та виділення CO_2 культурою, яка інтенсивно росте, утворюється вугільна кислота, через що значення рН може значно знижуватися. Це може мати негативний вплив на метаболічні процеси міцеліальної культури, а культивування в динамічних умовах із застосуванням перемішувачів та аеруючих пристроїв може в значній мірі вирішити цю проблему.

ВИСНОВКИ

Таким чином, адаптовано спосіб глибинного культивування вищих базидіоміцетів з урахуванням впливу співвідношення об'єму живильного середовища та інокулюму, ступеня подрібненості останнього та терміну ферментації. Технологія дозволяє значно скоротити термін ферментації, оскільки культури є вже пристосованими до умов глибинного культивування і мають значну кількість новоутворених фрагментів однакової маси в активній фазі росту. Аналізуючи результати дослідження росту 79 штамів 18 видів ксилотрофних базидіоміцетів при глибинному культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі можна зробити наступні висновки. Досліджені види розподіляються на три групи за розміром, формою і структурою пелетів. Так, для видів *L. edodes*, *P. citrinopileatus*, *G. lucidum*, *I. lacteus*, *G. frondosa*, *L. sulphureus* характерні дрібні гладенькі пелети від сферичної до неправильної форми з однорідною щільною структурою. Для видів *A. cylindracea*, *F. velutipes*, *F. hepatica*, *P. eryngii*, *F. fomentarius*, *D. quercina* та роду *Trametes* характерні середні за розміром, сферичні, з більш щільним центром та рихлим зовнішнім шаром пелети, часто з радіальними міцеліальними тяжами. У третини штамів *P. ostreatus* спостерігали великі за розміром пелети з щільним зовнішнім шаром та рихлим центром, що лізувався. Незалежно від характеристик пелетів, виділяються види, здатні до швидкого, помірного та низького накопичення АСБ. До першої групи можна віднести *A. cylindracea*, *F. hepatica*, *S. commune*, *P. eryngii*, *D. quercina*, види роду *Trametes*. До другої – *G. lucidum*, *I. lacteus*, *F. fomentarius*, *T. biforme*. До третьої – *L. edodes*, *P. citrinopileatus*, *G. frondosa*, *L. sulphureus*. Приріст біомаси штамів видів *F. velutipes* та *P. ostreatus* коливався в широких межах, причому штами з високою інтенсивністю росту значно знижують вихідне значення рН КФ. За отриманими результатами встановлено видову і штамову специфічність культурально-морфологічних характеристик досліджених базидіоміцетів на основі визначення приросту біомаси, питомої швидкості росту, водневого показника культурального фільтрату та вивчення структури пелетів. Виявлені особливості росту можуть бути використані при подальших дослідженнях біосинтетичних характеристик глибинних культур ксилотрофних базидіоміцетів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Феофилова Е.П. Новые биотехнологии получения биологически активных веществ из мицелиальных грибов / Е.П. Феофилова // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. 9. – С. 195 – 196.
- Lee B.C. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa* / B.C. Lee, J.T. Baea, H.B. Pyoa et al. // Enzyme and Microbial Technology. – 2004. – № 35. – P. 369–376.
- Wasser S.P. Medicinal mushrooms: past, present and future / S.P. Wasser, K.M. Sytnik, A.S. Buchalo, E.F. Solomko // Ukr. Botan. Journ. – 2002. – 59, №5. – P. 499 – 524.
- Lindequist U. The Pharmacological Potential of Mushrooms / U. Lindequist, T.H.J. Niedermeyer, W.D. Julich // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2005. – 2, №3. – P. 285 – 299.
- Бадалян С.М. Основные группы и терапевтическая значимость биоактивных метаболитов, образуемых макромицетами / С. М. Бадалян // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – 3, №1. – С. 16 – 23.
- Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.
- Соломко Э.Ф. Перспективы использования высших базидиомицетов в микробиологической промышленности / Э. Ф. Соломко, И. А. Дудка // ВНИИСЭНТИ: Обзорная информация. Сер. 3. – М., 1985. – 48 с.
- Wagner R. Current Techniques for the Cultivation of *Ganoderma lucidum* for the Production of Biomass, Ganoderic Acid, and Polysaccharides / R. Wagner, D.A. Mitchell, G.L. Sasaki et al. // Food Technol. Biotechnol. – 2003. – 41, № 4. – P. 371 – 382.
- Ліновицька В.М. Підбір умов глибинного культивування *Grifola frondosa* як основи для створення біотехнологій отримання лікувально-профілактичних препаратів / В.М. Ліновицька, А.С. Бухало, О.М. Дуган. // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2011. – 3. – С. 56 – 60.
- Уфимцева О.В. Получение биомассы мицелия грибов вешенки обыкновенной P 05/88 *Pleurotus ostreatus* и серно-желтого трутовика LS 1-06 *Laetiporus sulphureus* в глубинных условиях / О.В. Уфимцева, П.В. Миронов // Хвойные бореальной зоны. – 2009. – 26, № 2. – С. 294 – 296.
- Бабицкая В.Г. Новые биологически активные добавки на основе глубинного мицелия базидиальных грибов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.С. Гвоздкова // Успехи медицинской микологии. – 2006. – Т.7. – С. 178 – 180.
- Щерба В.В. Углеводы глубинного мицелия ксилотрофных базидиомицетов / В.В. Щерба, В.Г. Бабицкая // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – 41, №2. – С. 194 – 199.



- Винаров А.Ю. Ферментационная аппаратура для процессов микробиологического синтеза / А.Ю. Винаров, Л.С. Гордеев, А.А. Кухаренко, В.И. Панфилов / под ред. В.А. Быкова. – М., 2005. – 278 с.
- Kim S.W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media / S.W. Kim, H.J. Hwang, J.P. Park et al. // Lett. Appl. Microbiol. – 2002. – №34. – P. 56 – 61.
- Garibova L.V. Growth and Morphological Characteristics of the Reishi mushroom *Ganoderma lucidum* as Functions of Cultivation Conditions. / L.V. Garibova, A.V. Antimonova, L.A. Zav'yalova, L.M. Krasnopol'skaya // Mikol. Fitopatol. – 2003. – 37, № 3. – P. 14 – 19.
- Гарибова Л.В. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева. – М.: КМК, 2005. – 220 с.
- Чайка О.В. Ріст та інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – 3 (15). – С. 88 – 95.
- Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького національного університету. Серія А природничі науки. – Донецьк, ДонНУ, 2012. – № 1. – С. 209 – 213.
- Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С. П. Вассер, И. А. Элланская. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
- Дудчик Н.В. Использование микроботестирования при оценке токсичности химических веществ в окружающей среде / Н.В. Дудчик // Гигиена и санитария. – 2009. – № 1. – С. 84 – 87.
- Приседський Ю.Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. – Донецьк: ДонНУ, 2005. – 75 с.
- Патент 74241 України. Спосіб глибинного культивування вищих базидіоміцетів / Чайка О.В., Федотов О.В. Заявка № u201203276, від 20.03.2012, МПК (2006.01), кл. A01G1/04, C12N1/14 Бюл. № 20, від 25.10.2012.

REFERENCES

- Feofilova, E.P. (2007). New biotechnologies for production of biologically active compounds from filamentous fungi. *Successes Medical Mycology*. 9, 195-196.

- Lee, B.C., Baea, J.T., & Pyoa, H.B. et al. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*. 35, 369-376.
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms: past, present and future. *Ukr. Botan. Journ.* 59 (5), 499-524.
- Lindequist, U. Niedermeyer, T.H.J., & Julich, W.D. (2005) The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2 (3), 285-299.
- Badaljan, S.M. (2000). Major groups and therapeutic significance of bioactive metabolites formed macromycetes. *Problems of Medical Mycology*. 3 (1), 16-23.
- Bukhalo, A.S. (1988). Higher edible Basidiomycetes in pure culture. K.: Naukova Dumka.
- Solomko, E.F., & Dudka, I.A. (1985). Prospects for the use of higher basidiomycetes in the microbiological industry. *VNIISENTI: Review* 3.
- Wagner, R., Mitchell, D.A., Sasaki, G.L. et al. (2003). Current Techniques for the Cultivation of *Ganoderma lucidum* for the Production of Biomass, Ganoderic Acid, and Polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (4), 371-82.



Linovitska, V.M., Booze, A.S., Dugan, O.M. (2011). Selection conditions deep cultivation *Grifola frondosa* as a basis for creating the biotechnology medical drugs. *Naukovi Visti NTUU KPI*. 3, 56-60.

Ufimtseva, O.V., Mironov, P.V. (2009). Getting biomass oyster mushroom mycelium P 05/88 *Pleurotus ostreatus* and sulfur-yellow Polypore LS 1-06 *Laetiporus sulphureus* at deep cultivation. *Boreal coniferous zone*. 26 (2), 294-296.

Babitskaya, V.G., Szczerba, V.V., & Gvozdkova, T.S. (2006). New dietary supplements based on the submerged mycelium of basidiomycetes. *Successes Medical Mycology*. 7, 178-180.

Szczerba, V.V., Babitskaya, V.G. (2004). Carbohydrates submerged mycelium xylotrophic Basidiomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 41 (2), 194-199.

Vinarov, A.U., Gordeev, L.S., Kuharenko, A.A., & Panfilov, V.I. (2005). The fermentation process equipment for microbiological synthesis. Moscow.

Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P. et al. (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Lett. Appl. Microbiol*. 34, 56-61.

Garibova, L.V., Antimonova, A.V., Zav'yalova, L.A., & Krasnopolskaya, L.M. (2003). Growth and Morphological Characteristics of the Reishi mushroom

-
- Ganoderma lucidum as Functions of Cultivation Conditions. Mikol. Fitopatol. 37 (3), 14-19.
- Garibova, L.V., Lekomtseva, S.N. (2005). Fundamentals of mycology. The morphology and taxonomy of fungi and fungi-like organisms. Moscow: KMK.
- Chaika, O.V., Fedotov, O.V. (2011). Growth and intensity of lipid peroxidation of Pleurotus ostreatus strain P-107. Microbiology and Biotechnology. 3 (15), 88-95.
- Fedotov, O.V., Chaika, O.V., Voloshko, T.E., & Veligodska, A.K. (2012). Culture Collection of mushrooms – the basis of mycological research and strategy for biodiversity conservation basidiomycetes. Bulletin of Donetsk National University. Series A. 1, 209-213.
- Dudka, I.A., Wasser, S.P., & Ellanskaya, I.A. (1982). Methods of Experimental Mycology. Kiev: Naukova Dumka.
- Dudchik, N.V. (2009). Using of microbiotesting when assessing the toxicity of chemicals in the environment. Hygiene and sanitation. 1, 84-87.
- Prisedsky, J.G. (2005). The software package for statistical analysis of the results of biological experiments. Donetsk: Donetsk National University.
- Chaika, O.V., Fedotov, O.V. (2012). The patent 74241 of Ukraine. Method of higher Basidiomycetes submerged cultivation. Application № u201203276, on 20.03.2012, the MPK (2006.01), cl. A01G1/04, C12N1/14 Bull. Number 20, 25.10.2012.



Поступила в редакцію 19.02.2013

Как цитировать:

Чайка, О.В., Федотов, О.В. (2013). Культурально-морфологічні характеристики ксилотрофних базидіоміцетів у глибинній культурі. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 1 (7), 128-146. **crossref** [http://dx.doi.org/10.7905/bbmspu.v0i1\(7\).605](http://dx.doi.org/10.7905/bbmspu.v0i1(7).605)

© Чайка, Федотов, 2013

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).