

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РІСТ КСИЛОТРОФНИХ БАЗИДІОМІЦЕТІВ *POLYPORUS* *SQUAMOSUS* (HUDS.) FR. ТА *LAETIPORUS* *SULPHUREUS* (BULL.: FR.) MURRILL

Л.П. Дзигун, старший викладач

О.М. Дуган, доктор біологічних наук

Національний технічний університет України «КПІ»

Показано вплив джерел вуглецю та азоту і вихідного значення рН поживного середовища на ріст ксилотрофних базидіоміцетів *Polyporus squamosus* та *Laetiporus sulphureus*.

Ключові слова: вихідне рН поживного середовища, джерела вуглецю, джерела азоту, глибинне культивування, базидіоміцети, *P. squamosus*, *L. sulphureus*.

Вступ. Одним із прогресивніших методів отримання міцелію їстівних та лікарських грибів вважається глибинне культивування. Проте використання цього методу потребує вибору складу поживного середовища та визначення інших параметрів культивування, які б забезпечували всі фізіологічні потреби продуцентів. Одними із важливих факторів, що необхідні для отримання значної кількості фізіологічно активного міцелію грибів, є забезпечення їх доступними для живлення джерелами вуглецю та азоту, а також рН середовища. В той же час найчастіше для глибинного культивування більшості видів макроміцетів використовують середовища, які у різному співвідношенні містять як джерело вуглецю – глюкозу та як джерело азоту – пептон [1-3], що не завжди є оптимальними для певних видів грибів. Відомості щодо впливу рН на ріст окремих видів ксилотрофних макроміцетів також носять суперечливий та розрізнений характер [2, 4].

Одними з перспективних видів ксилотрофних базидіоміцетів є *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. та *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill, які за останнє десятиріччя набули статусу лікарських, що пов'язано з наявністю у складі їх плодових тіл та міцелію біологічно активних речовин з різними фармакологічними властивостями [5-18]. Проте достатніх та систематизованих відомостей щодо умов глибинного культивування

цих видів в літературі майже немає, тому дослідження впливу джерел вуглецевого й азотного живлення та початкового значення рН на ріст трутовиків сірчано-жовтого та лускатого є актуальним.

Мета роботи: встановити, як впливають на накопичення міцеліальної біомаси грибами *P. squamosus* і *L. sulphureus* різні джерела вуглецю, азоту та вихідне значення рН поживного середовища.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження були чотири штами *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (1518, 1772, 1773, 1774) та один штама *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (1826) з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ [19]. Культури зберігали на агаризованному пивному суслі (СА) при температурі +4°C.

Мікробіологічні методи, які використовували при виконанні цих досліджень, є загальноприйнятими для роботи з чистими культурами непатогенних мікроорганізмів, у тому числі міцеліальних грибів [20].

Ріст та динаміку змін основних ростових показників досліджували на рідкому середовищі такого складу, г/л [3]: глюкоза – 15; NH_4NO_3 – 3; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; CuSO_4 – 0,003; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; вода дистильована до 1 л, рН – 6,5.

Для дослідження впливу різних джерел вуглецю до середовища додавали у концентрації, еквівалентній 20 г/л глюкози, такі речовини: інулін, маніт, гліцерин, фруктозу, глюкозу, лактозу, ксилозу, мальтозу, галактозу, сахарозу та крохмаль.

Дослідження впливу джерела азоту проводили на середовищі, де як єдине джерело азоту використовували такі азотмісткі речовини: гістидин, лейцин, лізин, триптофан, аланін, аспарагін, пептон, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NaNO_2 та NH_4Cl – у концентрації, еквівалентній 2 г/л азоту [21].

Для дослідження впливу активної кислотності на ріст культури середовище готували на основі фосфатного буфера [22] та отримували діапазон значень рН після автоклавування від 4,65 до 7,51. Активну кислотність (рН) визначали за допомогою рН-метра.

Вихідний посівний матеріал готували шляхом пересіву культури в пробірку з СА. Отриманий за 7 діб міцелій пересівали в колби на проавтоклавоване синтетичне середовище з додаванням 1% соєвого борошна та 0,5%- неохмеленого пивного сусла і культивували при 28°C 6 діб поверхневим способом та 7 діб на качалці з перемішуванням 120-150 об./хв. Після чого здійснювали пересів на досліджувані рідкі живильні середовища в кількості 10 об. %.

Дослідження проводили протягом 7 діб у трьох повторностях. Культури вирощували на качалці (120 об./хв.) при 28±1°C.

Для визначення концентрації біомаси міцелій гриба відокремлювали від культуральної рідини і висушували у сушильній шафі при температурі 105°C до постійної маси. Концентрацію біомаси розраховували у грамах абсолютно сухої речовини на 1 л середовища.

Всі отримані експериментальні дані обробляли статистично [23].

Результати досліджень. Дереворуйнівні базидіальні гриби можуть споживати значну кількість різних джерел вуглецю. Серед моносахаридів глюкоза вважається універсальним джерелом вуглецю, хоча і не завжди забезпечує максимальний розвиток грибних культур. Досліджувані штами *L. sulphureus* та *P. squamosus* показали здатність рости на моно-, ди- та полісахаридах, а також спиртах.

Дослідження впливу джерел вуглецю на ріст трутовики сірчано-жовтого показало, що найсприятливішим джерелом вуглецю серед досліджуваних може вважатися крохмаль (3,25÷18,96 г/л) (рис.1, а), достатньо високе накопичення біомаси також було відмічене і на середовищах, що як джерело вуглецю містили глюкозу (0,2÷18,8 г/л) та гліцерин (3,2÷13,78 г/л) (рис.1, а). Найнижчі показники накопичення біомаси були відзначені для 3 штамів на середовищі з інуліном. Проте можливо відзначити певні штамові особливості, так, для штамів *L. sulphureus* 1518 та 1772 достатньо високий рівень накопичення біомаси спостерігався також на моносахариді ксилозі (2,92±0,02 г/л та 6,59±0,01 г/л, відповідно) та спирті маніті (1,60±0,01 г/л та 4,46±0,01 г/л, відповідно),

для штаму *L. sulphureus* 1774 – моносахариді фруктози ($4,73 \pm 0,02$ г/л), а для штаму *L. sulphureus* 1773 – моносахаридах фруктозі ($10,87 \pm 0,02$ г/л) та галактозі ($10,06 \pm 0,02$ г/л).

Таким чином, аналіз отриманих даних щодо споживання 11 джерел вуглецю свідчить, що рівень використання грибом *L. sulphureus* джерел вуглецю зростає з ускладненням їх хімічної природи (для вуглеводів) і навпаки зменшується (для спиртів). Переважне засвоєння видом *L. sulphureus* крохмалю свідчить про його здатність зростати на рослинних залишках.

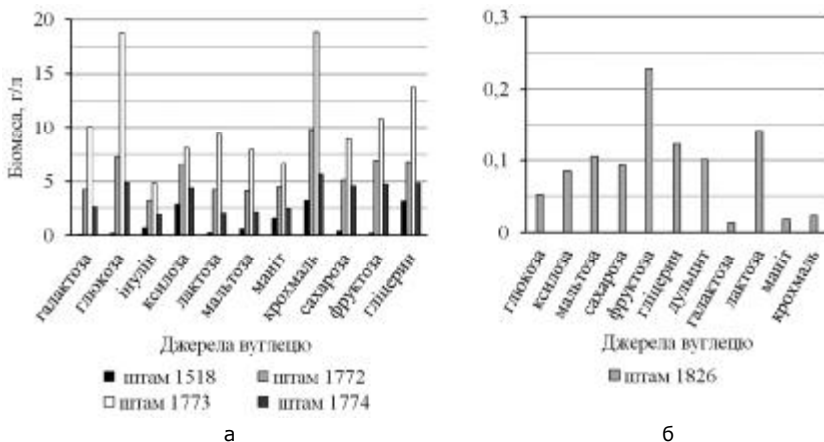


Рис. 1. Вплив різних джерел вуглецю на накопичення біомаси міцелію в умовах глибинного культивування штамами *L. sulphureus* (а) та *P. squamosus* (б)

Найбільш сприятливим джерелом вуглецю для штаму *P. squamosus* 1826 виявилася фруктоза, при рості на якій концентрація накопиченої біомаси становила $0,226 \pm 0,01$ г/л, що в 4 рази перевищує цей показник для глюкози (рис. 1, б). Серед дисахаридів найбільш сприятливим джерелом виявилася лактоза ($0,14 \pm 0,01$ г/л), що незначною мірою перевищило цей показник для сахарози, мальтози та ксиліози. Серед спиртів найбільш ефективним джерелом вуглецю виявився гліцерин, для якого накопичення біомаси становило $0,12 \pm 0,01$ г/л, незначною мірою йому поступився дульцит ($0,10 \pm 0,01$ г/л). Найбільш несприятливими джерелами вуглецю виявилися дисахарид – галактоза, спирт – маніт та полісахарид – крохмаль, для яких

накопичення біомаси було в 10 разів менше за цей показник на фруктозі (рис.1, б). Таким чином найбільш сприятливими джерелами вуглецю для досліджуваного штаму *P. squamosus* можуть вважатися фруктоза, лактоза та гліцерин.

Дослідження впливу джерел азоту на ріст труговика сірчано-жовтого показало, що найсприятливішим джерелом азоту серед досліджуваних може вважатися пептон ($2,1 \div 15,9$ г/л) (рис.2, а), що збігається з літературними даними [3]. Хоча достатньо високе накопичення біомаси також було відмічене і на середовищах, що в якості азоту містили NaNO_3 ($1,2 \div 15,62$ г/л) та лізин ($0,35 \div 15,3$ г/л) (рис.2, а), а низькі показники на середовищі з гістидином ($0,51 \div 3,93$ г/л). Проте слід відзначити певні штамові особливості при засвоєнні інших джерел азоту. Так, для штамів *L. sulphureus* 1772 та 1774 достатньо високе накопичення біомаси спостерігалось також ще на хлориді амонію ($4,32 \pm 0,01$ г/л та $5,21 \pm 0,01$ г/л, відповідно), для штаму *L. sulphureus* 1773 – триптофані ($14,40 \pm 0,02$ г/л) та нітраті амонію ($14,24 \pm 0,02$ г/л).

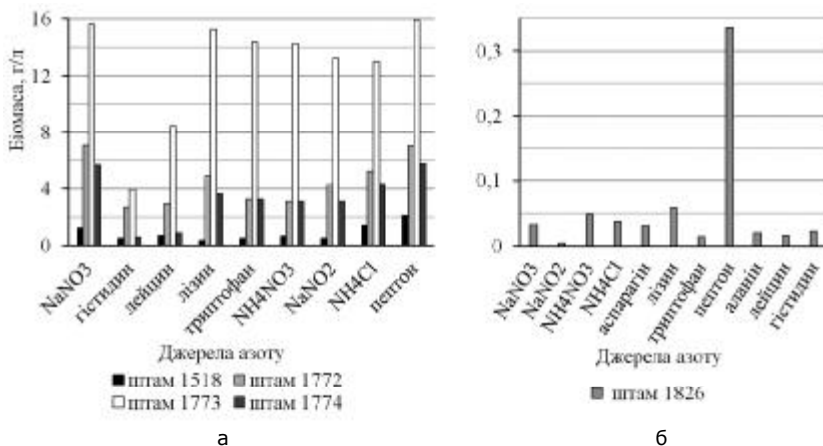


Рис.2. Вплив різних джерел азоту на накопичення біомаси штамами *L. sulphureus* (а) та *P. squamosus* (б) в умовах глибинного культивування

Як видно з діаграми (рис.2) для дослідженого штаму *P. squamosus* найбільше накопичення біомаси спостерігається на пептоні, де концентрація міцелію складала $0,336 \pm 0,01$ г/л, що у 8–10 разів перевищує цей показник для органічних джерел азоту, а саме амінокислот, та для неорганічних – солей амонію,

нітратів та нітритів. Найбільш несприятливими джерелами азоту (рис.2, б) виявилися нітрит натрію та триптофан.

Концентрація водневих іонів є одним із важливіших факторів, що регулюють ріст дереворуйнівних базидіальних грибів у чистій культурі. Як видно з рис. 3, для *L. sulphureus* 1518 та *P. squamosus* 1826 найбільш сприятливе початкове значення рН є 6,59 та 6,86 відповідно.

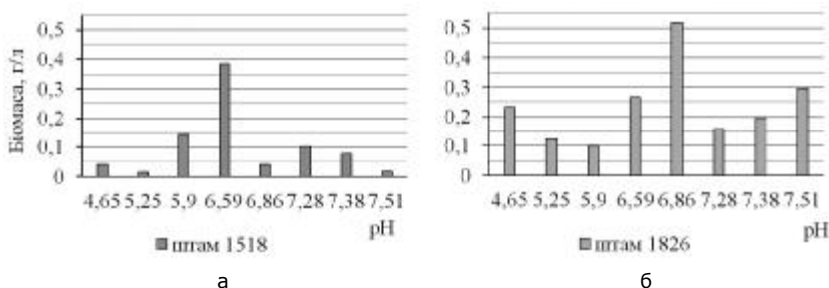


Рис.3. Вплив вихідної концентрації водневих іонів на накопичення біомаси штамми *L. sulphureus* (а) та *P. squamosus* (б) в умовах глибинного культивування

Для *L. sulphureus* 1518 за рН 6,59 накопичення біомаси складало $0,38 \pm 0,01$ г/л, тоді як при відхиленні від цього значення в лужний бік спостерігалось різке зменшення цього показника ($0,04 \pm 0,03$ г/л). При відхиленні вихідного рН в кислий бік накопичення грибом біомаси знижувалося, але не настільки різко (рис. 3, а), що пов'язано з приналежністю *L. sulphureus* до грибів збудників бурої гнилі деревини, яким притаманна ацидофільність [24].

Так, накопичення біомаси для *P. squamosus* 1826 за рН 6,86 складало $0,52 \pm 0,01$ г/л, що вдвічі перевищує цей показник для інших значень рН (рис.3, б). А при відхиленні від значення рН 6,86 спостерігається різке зниження концентрації накопиченої біомаси до значення $0,27 \pm 0,02$ г/л у бік кислих значень та до $0,16 \pm 0,02$ г/л у лужний бік. За інших значень вихідного рН накопичення біомаси міцелію коливається в межах від $0,099 \pm 0,001$ г/л до $0,296 \pm 0,01$ г/л. Таким чином, значення рН 6,86 можливо вважати найбільш сприятливим для культивування досліджуваного штаму *P. squamosus*.

Висновки. Показано здатність досліджуваних штамів *L. sulphureus* та *P. squamosus* рости на середовищах з моно-, ди- та полісахаридами, а також спиртами, як джерелами вуглецю, та органічними й неорганічними джерелами азоту.

Встановлено, що як джерела азоту для отримання біомаси штамів *L. sulphureus* найсприятливішими є пептон або нітрат натрію, а як джерела вуглецю – крохмаль, гліцерин та глюкоза. Для отримання біомаси штаму *P. squamosus* найсприятливішими джерелами вуглецю є фруктоза, лактоза та гліцерин, а як джерело азоту – пептон.

Виявлено, що сприятливим для максимального накопичення біомаси досліджуваним штамом *L. sulphureus* є вихідне значення рН середовища **6,59**, тоді як для створення сприятливих умов для культивування штаму *P. squamosus* необхідним є початкове рН середовища **6,86**.

Література:

1. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* / А. Н. Капич, Т. С. Гвоздкова, Э. Б. Квачева и др. // Успехи медицинской микологии : материалы второго Всероссийского конгресса по медицинской микологии. — Т. 3. — М. : Национальная Академия Микологии, 2004. — С. 146—148.
2. Fang Q.-H. Effect of initial pH on Ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* / Q.-H. Fang, J.-J. Zhong // Process Biochemistry. — 2002. — 37. — P. 769—774.
3. Okamura T. Cultural characteristics of *Laetiporus sulphureus*, producing an anti-thrombin substance / Tokumitsu Okamura, Tomomi Takeno, Shoko Fukuda et al. // Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci. — 2000. — Vol. 48. — P. 65—68.
4. Соломко Э. Ф. Влияние рН среды на кинетику роста *Pleurotus ostreatus* в глубоинной культуре / Э. Ф. Соломко, О. А. Фёдоров // Микол. и фитопатол. — 1988. — Т. 22, № 6. — С. 537—542.
5. Бабахин А. А. Иммуносупрессорная активность мицелиального гриба *Polyporus squamosus* / А. А. Бабахин // Аллергия, астма и клиническая иммунология. — 2000. — № 1. — С. 50—51.
6. Бадалян С. М. Основные группы и терапевтическая значимость биоактивных метаболитов, образуемых макромицетами / С. М. Бадалян // Пробл. мед. микол. — 2000. — Т. 3, № 1. — С. 16—23.
7. Babakhin A. A. In vivo and in vitro immunomodulation by the of extract of the mycelium fungus *Polyporus squamosus* / A. A. Babakhin, L. A. Majoul, A. A. Vedernikov et al. // Allergy Asthma Proc. — 1997. — Vol. 18, No 5. — P. 301—310.
8. Hwang H. S. Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties / Hee Sun Hwang, Sung Hak Lee, Yu Mi Baek, Sang Woo Kim et al. // Appl Microbiol Biotechnol. — 2008. — Vol. 78. — P. 419—429.
9. Koch J. The influence of Selected Higher Basidiomycetes on the Binding of Lipopolysaccharide to CD14+ Cells and on the Release of Cytokines / Jacqueline Koch,

Sabrina Witt and Ulrike Lindequist // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. — 2002. — Vol. 4. — P. 229—235.

10. Lear M. J. Laetirobin from the Parasitic Growth of *Laetiporus sulphureus* on *Robinia pseudoacacia* / Martin J. Lear, Oliver Simon, Timothy L. Foley et al. // *J. Nat. Prod.* — 2009. — Vol. 72, № 11. — P. 1980—1987.

11. León F. Lanostanoid triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells / Francisco León, José Quintana, Augusto Rivera et al. // *J. Nat. Prod.* — 2004. — Vol. 67. — P. 2008—2011.

12. Mlinarič A. Screening of selected wood-damaging fungi for the HIV-1 reverse transcriptase inhibitors / Alesš Mlinarič, Javor Kac, Franc Pohleven // *Acta Pharm.* — 2005. — Vol. 55. — P. 69—79.

13. Okamura T. Development of mushrooms for thrombosis prevention by protoplast fusion / Tokumitsu Okamura, Tomomi Takeno, Mizuho Dohi et al. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. — 2000. — Vol. 89, № 5. — P. 474—478.

14. Shen Q. Potential pharmaceutical resours of the Qinling Mountain in central China: medicinal fungi / Qi Shen, Wei Chen, Zhuyun Yan, Zhenfeng Xie // *Front. Biol. China*. — 2009. — Vol. 4, № 1. — P. 89—93.

15. Stamets P. Novel Antimicrobials from mushrooms / Paul Stamets // *Herbal Gram*. — 2002 — Vol. 54. — P. 29—33.

16. Wasser S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S. P. Wasser // *Appl Microbiol Biotechnol.* — 2002. — Vol. 60. — P. 258—274.

17. Yassin M. Submerged cultured mycelium extracts of higher basidiomycetes mushrooms selectively inhibit proliferation and induce differentiation of K562 human chronic myelogenous leukemia cells / Majed Yassin, Jamal A. Mahajna, and Solomon P. Wasser // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. — 2003. — Vol. 5. — P. 261—276.

18. Бухало А. С. Каталог культур шапинкових грибів (ІВК) / А. С. Бухало, Н. Ю. Мітропольська, О. Б. Михайлова. — К. : Славутич-дельфін, 2006. — 36 с.

19. Методи експериментальної мікології : справочник / Под ред. В. І. Білай. — К. : Наук. думка, 1982. — 550 с.

20. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Отв. ред. Дудка И. А. — К. : Наук. думка, 1988. — 144 с.

21. Рабинович В. А. Краткий химический справочник / В. А. Рабинович, З. Я. Хавин — Л. : Химия, 1977. — 376 с.

22. Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной биологии / Г. Н. Зайцев — М. : Наука, 1984. — 424 с.

23. Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов / Владимир Рипачек; [пер. с чешского М. Гашковой]. — М. : Лес. пром., 1967. — 276 с.