

УДК 582.284.99 : 57.083.13

© Л. П. Дзыгун, И. А. Дудка

**ВЛИЯНИЕ ТВЕРДЫХ ДОБАВОК НА РОСТ *LAETIPORUS SULPHUREUS*
В ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЕ**DZYGUN L. P., DUDKA I. A. INFLUENCE OF SOLID ADDITIONS ON GROWTH
OF THE MEDICINAL MUSHROOM *LAETIPORUS SULPHUREUS* IN SUBMERGED CULTURE

Базидиальные макромицеты широко известны как источник биологически активных соединений разной химической природы, которые в значительной мере определяют пищевую ценность грибов, а также их лекарственные свойства, в частности иммуномодулирующее, антиоксидантное, онкостатическое, антимикробное, противовирусное действие (Mizuno et al., 1995; Денисова, 1998; Mizuno, 1999; Бадалян, 2000; Ikekawa, 2001; Вассер и др., 2002; Белова, 2004). Именно поэтому очень важным является исследование роста базидиомицетов на разных питательных средах, особенностей их физиологии и морфогенеза в глубинной культуре. Данные таких исследований необходимы для разработки технологий крупномасштабного культивирования макромицетов-продуцентов биомассы и ценных вторичных метаболитов (Tidke et al., 2006).

Laetiporus sulphureus (Bull.: Fr.) Murrill (*Basidiomycota*) принадлежит к экологической группе дереворазрушающих базидиальных макромицетов. Этот гриб характеризуется наличием в плодовых телах и глубинном мицелии комплекса биологически активных веществ, в том числе каротиноидов и липофильных соединений, в частности полиеновых жирных кислот, стероидов, фосфолипидов. Указанные соединения обладают антимутагенными, иммуномодулирующими, антиоксидантными, радиопротекторными и другими фармакологическими свойствами (Гвоздкова и др., 2004а, 2004б; Капич и др., 2004; Озерова, 2006). Липокаротиноидный комплекс является основным действующим началом биологически активной добавки «Летипорин», имеющей антиоксидантное, радио- и гепатопротекторное действие (Гвоздкова и др., 2006). Молодые плодовые тела *L. sulphureus* обладают высокой пищевой ценностью (Бондарцев, 1953; Маслова, 1972).

Для культивирования дереворазрушающих грибов успешно используются натуральные и синтетические питательные среды, достаточно простые по своему составу, что является важным условием для дальнейшей разработки технологии их промышленного выращивания. Одним из требований, которые предъявляют к промышленным продуцентам, является их способность утилизировать дешевые недефицитные источники питания. Подобными субстратами могут быть отходы сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности, являющиеся экономически выгодными компонентами жидких комплексных питательных сред (Высшие., 1983; Бухало, 1988).

Метод глубинного культивирования базидиальных макромицетов имеет ряд преимуществ по сравнению с выращиванием их на плотных средах. Он облегчает выделение экзогенных продуктов метаболизма, обеспечивает утилизацию жидких и растворимых отходов, дает возможность получать стерильный мицелий, который успеш-

но используется в качестве посевного материала для переработки растительных отходов.

Сведения о росте *L. sulphureus* на разных жидких средах довольно ограничены и в большей степени имеют сравнительный характер с другими видами базидиомицетов (Бухало, 1988; Озерова, 2006). Это определяет необходимость исследования его морфологических и физиологических свойств в условиях глубинного культивирования, что и является целью данной работы.

Объектом исследования были четыре штамма *L. sulphureus* 1518, 1772, 1773, 1774 из коллекции шляпочных грибов Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАНУ. Культуры сохраняли на агаризованном пивном сусле при температуре 4 °С.

Микробиологические методы, использованные при выполнении данного исследования, являются общепринятыми для работы с чистыми культурами непатогенных микроорганизмов, в том числе мицелиальных грибов (Методы..., 1982).

Исследование роста и динамики изменений основных ростовых показателей осуществляли на жидких средах следующего состава, г/л (Бухало, 1988; Тихонова и др., 2001):

1) 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 дистиллированная до 1 л, pH 6.5;

2) глюкоза — 10, соевая мука — 15, NaCl — 3, мел — 3 и вода водопроводная до 1 л, pH 7.0;

3) глюкоза — 10, пептон — 5, KH_2PO_4 — 0.6, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5, K_2HPO_4 — 0.4, вода водопроводная до 1 л, pH 7.0.

В качестве добавок к среде 1 апробировали измельченные до порошковидного состояния виноградные и яблочные выжимки, шелуху семян подсолнечника, ольховые и сосновые опилки, соевую, гороховую и кукурузную муку, зародыши пшеницы, крахмал, карбоксиметилцеллюлозу. Приведенные добавки вносили в колбы в количестве 1 % от объема среды перед стерилизацией.

Исходный посевной материал получали путем пересева культуры в пробирку с агаризованным пивным суслом. Полученный за 7 суток мицелий пересевали в колбы на проавтоклавированную синтетическую среду 1 и культивировали 6 суток поверхностным способом и 7 суток при 28 °С на качалке с перемешиванием 120—150 об./мин, после чего осуществляли пересев на исследуемые жидкие питательные среды в количестве 100 об. %.

Исследование проводили на протяжении 7—14 суток в трех повторностях. Динамику изменения основных ростовых показателей фиксировали каждые 2-е сутки. Культуры выращивали на качалке (120 об./мин) при 28 ± 1 °С.

Для определения концентрации биомассы мицелий гриба отделяли от культуральной жидкости и высушивали в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы. Концентрацию биомассы рассчитывали в г сухого вещества на 1 л среды.

Активную кислотность (рН) определяли с помощью рН-метра каждые 2-е сутки.

Определение сухих веществ в культуральной жидкости проводили весовым методом. Культуральный фильтрат объемом 5 мл испаряли, а потом высушивали в сушильном шкафу при 105 °С до абсолютно сухой массы в предварительно взвешенном бюксе. Концентрацию сухих веществ рассчитывали в г/л.

Определение содержания белка в культуральной жидкости проводили по методу Шантарле и Полака (Клечак, 1991).

Все полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически (Зайцев, 1984).

Исследование роста мицелия в глубинной культуре показало, что наибольшее накопление биомассы исследуемыми штаммами *L. sulphureus* происходило на средах с добавлением соевой (9.23—10.52 г/л), гороховой (7.33—7.54 г/л) и кукурузной (6.12—6.48 г/л) муки, крахмала (6.71—7.76 г/л) и ольховых опилок (5.84—6.12 г/л) (рис. 1). Несколько меньшие показатели были получены при культивировании штам-

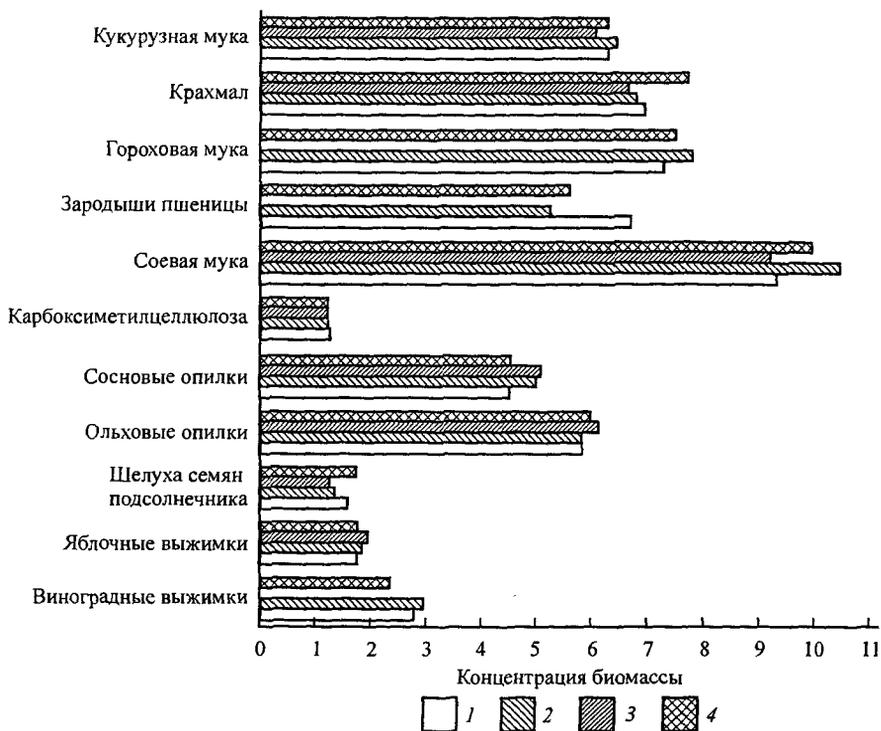


Рис. 1. Влияние добавок к среде 1 на накопление биомассы грибом *Laetiporus sulphureus*.
Штаммы: 1 — 1774, 2 — 1773, 3 — 1772, 4 — 1518.

мов *L. sulphureus* на средах с пшеничными зародышами и сосновыми опилками (5.90 ± 0.54 и 5.95 ± 0.3 г/л соответственно). Меньше всего накопление биомассы у исследуемых штаммов зарегистрировано на средах с карбоксиметилцеллюлозой (1.26 ± 0.10 г/л). Другими исследователями также отмечено, что наилучшие ростовые показатели *L. sulphureus* наблюдались при глубинном культивировании на жидких питательных средах с добавлением соевой муки и опилок лиственных пород деревьев (Тихонова и др., 2001, 2002; Сорока и др., 2002a). Положительное влияние на рост биомассы *L. sulphureus* таких добавок, как кукурузная мука, сосновые опилки, виноградные и яблочные выжимки и шелуха семян подсолнечника, нами показано впервые.

В целом полученные результаты свидетельствуют о наличии сходства роста штаммов *L. sulphureus* на средах с разными добавками. В то же время наблюдаются и определенные штаммовые отличия. Так, для штаммов *L. sulphureus* 1773 и 1518 лучший рост отмечен на средах с соевой мукой (10.52 и 10.00 г/л). Для штамма *L. sulphureus* 1773 достаточно существенное накопление биомассы наблюдалось также на среде с зародышами пшеницы (6.74 г/л), а для штамма *L. sulphureus* 1772 — с ольховыми опилками (6.12 г/л) по сравнению с другими штаммами на тех же средах (рис. 1). Проведенный эксперимент показал, что добавление в среду соевой муки является наиболее благоприятным для культивирования штаммов вида *L. sulphureus* по сравнению с другими добавками, которые были использованы.

В процессе роста исследуемых штаммов *L. sulphureus* на средах с разными добавками было отмечено значительное снижение pH культуральной жидкости. Наиболее

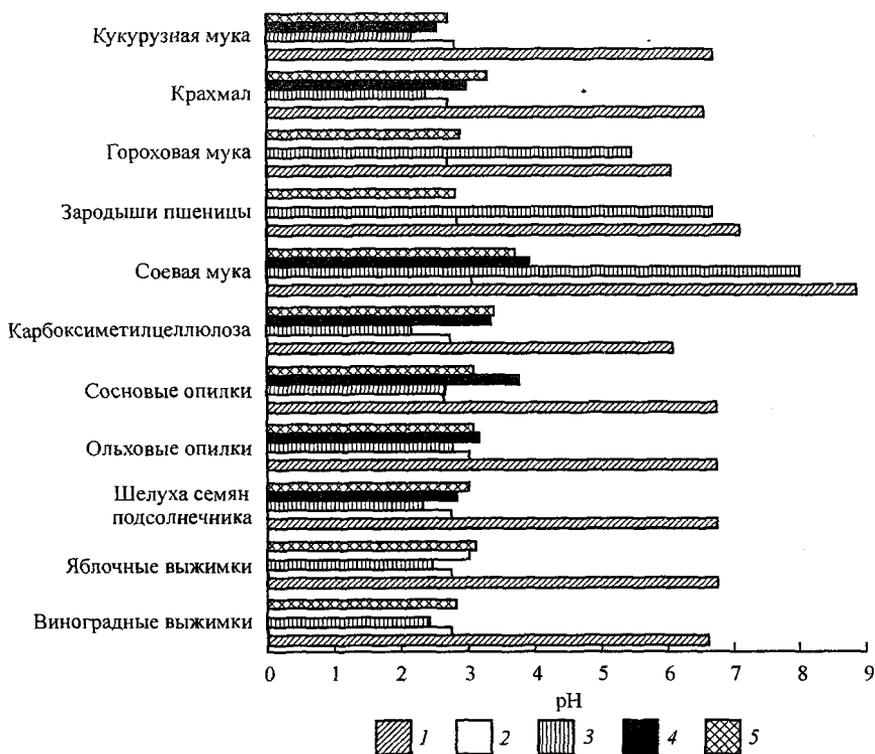


Рис. 2. Влияние добавок к среде 1 на конечное значение рН культуральной жидкости гриба *Laetiporus sulphureus*.

1 — исходная среда, 2 — штамм 1774, 3 — 1773, 4 — 1772, 5 — 1518.

существенное снижение рН по сравнению с этим показателем в исходной среде отмечено при добавлении крахмала и кукурузной муки. Самая низкая кислотность (2.38 и 2.17 рН) культуральной жидкости зарегистрирована в конце культивирования (7-е сутки) штамма *L. sulphureus* 1773 (рис. 2). Для других штаммов на средах с добавками кислотность колебалась в пределах от 2.6 до 5.0 рН. Существенное снижение кислотности культуральной жидкости в процессе роста *L. sulphureus* отмечено и на других средах (Ефременкова и др., 2006; Тихонова и др., 2002). Учитывая отсутствие соответствующих сведений, определение оптимального для роста штаммов *L. sulphureus* значения рН среды требует дальнейших исследований.

Важной характеристикой продуцента для дальнейшей разработки технологии промышленного культивирования является изменение его ростовых показателей в динамике, однако *L. sulphureus* в этом отношении остается практически неисследованным. Для изучения динамики роста нами был отобран штамм 1518, отличавшийся наиболее стабильными показателями при всех условиях исследования.

В глубинной культуре *L. sulphureus* растет преимущественно в анаморфной форме с образованием терминальных и интеркалярных хламидоспор (Бухало, 1988). Для формирования мицелия грибу необходимы точки для закрепления гиф и дальнейшего роста, в роли которых могут выступать различные твердые добавки к среде. Так, у исследованного штамма 1518 в глубинной культуре наблюдалось существенное различие морфологических признаков в зависимости от состава экспериментальной

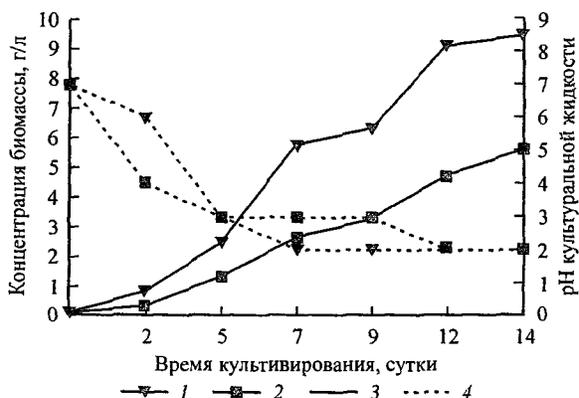


Рис. 3. Динамика накопления биомассы и изменения pH среды в процессе глубинного культивирования *Laetiporus sulphureus* (штамм 1518).

1 — среда 2, 2 — среда 3, 3 — динамика накопления биомассы, 4 — изменение pH культуральной жидкости.

среды. На среде 2 на 10–14-е сутки культивирования образовывались равномерно распределенные по всему объему культуральной жидкости мицелиальные шарики ярко-оранжевого цвета диам. 3–4 мм. На среде 3, несмотря на ее более богатый питательными компонентами состав, образование шариков не происходило. На протяжении всего времени культивирования (14 суток) мицелиальная масса была неоднородной и в культуральной жидкости наблюдались лишь обрывки гиф и хламидоспоры. Подобное явление для *L. sulphureus* отмечено и другими исследователями (Озерова, 2006).

Результаты изучения динамики роста *L. sulphureus* 1518 свидетельствуют о том, что на среде 2, содержащей соевую муку, накопление биомассы было значительно более интенсивным, чем на среде 3, в которой отсутствовали твердые добавки (рис. 3). Максимальное накопление биомассы на среде приходилось на 14-е сутки культивирования и составляло 9.45 г/л. На среде 3 этот показатель за тот же период культивирования составлял всего лишь 5.62 г/л. На среде 2 культура *L. sulphureus* 1518 почти вышла на стационарную фазу роста, а на среде 3 находилась только на стадии активного накопления биомассы. Таким образом, внесение в питательную среду добавок, в частности соевой муки, позволяет значительно увеличить накопление биомассы и сократить сроки культивирования.

Как отмечено в эксперименте, исследуемый штамм значительно закисляет обе среды, что можно объяснить ацидофильностью гриба (рис. 3). Это свойство характерно для грибов-возбудителей бурой гнили, к которым относится и *L. sulphureus*. Закисление культуральной жидкости некоторые авторы объясняют накоплением шавелевой кислоты (Сорока и др., 2002б; Тихонова и др., 2002; Ефременкова и др., 2006). Значительное снижение pH от 6–7 в исходной питательной среде до 4–2 в конце культивирования *L. sulphureus* можно считать положительным аспектом при дальнейшем выращивании гриба, поскольку снижается вероятность инфицирования микробными контаминантами, развитие которых тормозится в кислой среде, тогда как гриб продолжает расти (рис. 3).

Важным показателем эффективности культивирования является динамика потребления грибом питательных компонентов среды, комплексное изменение которых определялось по концентрации сухих веществ. Снижение концентрации сухих веществ происходило при росте гриба на обеих средах (рис. 4), однако интенсивность снижения была разной. Так, на среде 2 наиболее резкое уменьшение концентрации сухих веществ приходилось на 5-е сутки культивирования, когда содержание сухих

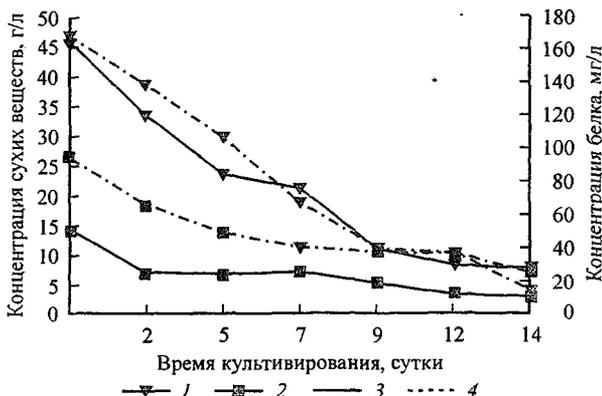


Рис. 4. Динамика изменения концентрации сухих веществ и концентрации общего белка при культивировании *Lactiporus sulphureus* (штамм 1518) на жидких питательных средах.

1 — среда 2, 2 — среда 3, 3 — изменение концентрации сухих веществ, 4 — изменение концентрации общего белка.

веществ снизилось почти в 4.5 раза по сравнению с исходной питательной средой. На среде 3 наиболее интенсивное падение концентрации сухих веществ приходилось на 2-е сутки, а их содержание составляло треть от исходного количества в питательной среде. Снижение концентрации сухих веществ четко коррелирует с накоплением биомассы. Наряду с этим в культуральной жидкости на обеих средах снижалась и концентрация белка (рис. 4). Динамика изменения концентрации белка в значительной мере повторяла таковую сухих веществ в культуральной жидкости. На 10—12-е сутки роста содержание белка выходило практически на одинаковый уровень в обеих средах и составляло 36.9 мг/л. Очевидно, белковый компонент сред также используется грибом для роста.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы.

Оценка возможности применения отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности в качестве компонентов комплексных питательных сред показала перспективность использования в первую очередь таких добавок, как соевая, гороховая и кукурузная мука, крахмал, ольховые опилки.

Добавление соевой муки в среду для культивирования *L. sulphureus* способствовало формированию мицелия и увеличению накопления его биомассы в глубинной культуре почти в 2 раза по сравнению с этим показателем на среде без добавок.

Значительное снижение pH среды с 6.5—7 до 2.2—2.3 происходило в процессе роста *L. sulphureus* независимо от состава использованных сред и добавок.

За время культивирования гриб использовал для накопления биомассы питательные компоненты сред, в результате чего концентрация сухих веществ и белка за период культивирования снизилась в 4.5 раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бадалян С. М. Основные группы и терапевтическая значимость биоактивных метаболитов, образуемых макромицетами // Пробл. медицинской микологии. 2000. Т. 3, № 1. С. 16—23.
- Белова Н. В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38, № 2. С. 1—7.
- Бондарцев А. С. Трутовые грибы европейской части СССР и Кавказа. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953. 1106 с.
- Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Под ред. И. А. Дудка. Киев: Наук. думка, 1988. 144 с.

Вассер С. П., Сытник К. М., Бухало А. С., Соломко Э. Ф. Лекарственные грибы: прошлое, настоящее и будущее // Укр. бот. журн. 2002. Т. 59, № 5. С. 499—523 (на англ.).

Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Под ред. И. А. Дудка. Киев: Наук. думка, 1983. 312 с.

Гвоздкова Т. С., Мишин Л. Т., Черноок Т. В., Пленина Л. В., Капич А. Н. Глубинный мицелий скантофиллсодержащего гриба *Laetiporus sulphureus* — основа новой биологически активной добавки // Усп. медицинской микологии. 2004а. Т. 3. С. 218—220.

Гвоздкова Т. С., Пленина Л. В., Капич А. Н., Черноок Т. В. Лекарственный базидиальный гриб *Laetiporus sulphureus* — источник биологических активных соединений // Перспективы использования лекарственных грибов при решении медико-экологических проблем: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. (Киев, сентябрь, 2004). Киев, 2004б. С. 18—20.

Гвоздкова Т. С., Черноок Т. В., Бабицкая В. Г. Разработка путей стабилизации биологически активной добавки «Летипорин» // Усп. медицинской микологии. 2006. Т. 7. С. 185—187.

Денисова Н. П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 1998. 59 с.

Ефременкова О. В., Тихонова О. В., Ершова Е. Ю., Куляева В. В., Катруха Г. С., Камзолкина О. В., Иванов А. А. Антимикробные свойства базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования // Усп. медицинской микологии. 2006. Т. 7. С. 280—283.

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

Капич А. Н., Гвоздкова Т. С., Квачева З. Б., Николаева С. Н., Шишкина Л. Н., Галкин С., Хатакка А., Конопля Е. Ф., Верещако Г. Г., Ходосовская А. М., Рутковская Ж. А. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* // Усп. медицинской микологии. 2004. Т. 3. С. 146—148.

Клечак И. Р. Оптимизация режимов получения посевного материала и технологические требования к биореактору для производства кормового белкового продукта из виноградных выжимок: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Ялта, 1991. 21 с.

Маслова Р. А. Рост и развитие некоторых афиллофоровых грибов на различных питательных средах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1972. 25 с.

Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В. И. Билай. Киев: Наук. думка, 1982. 550 с.

Озерова Н. С. Экологические особенности синотрофных базидиомицетов родов *Laetiporus* Murrill и *Ganoderma* P. Karst. Пензенской области: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2006. 23 с.

Сорока О. Н., Гвоздкова Т. С., Залашко М. В. Влияние источника углерода на рост и образование каротиноидов базидиальным грибом *Laetiporus sulphureus* M131 // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біялагічных навук. 2002а. № 3. С. 112—114.

Сорока О. Н., Гвоздкова Т. С., Залашко М. В. Каротиногенез гриба *Laetiporus sulphureus* M131 на различных питательных субстратах // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біялагічных навук. 2002б. № 4. С. 113—115.

Тихонова О. В., Ершова Е. Ю., Лурье Л. М., Куляева В. В., Катруха Г. С., Камзолкина О. В., Ефременкова О. В., Дудник Ю. В. Антимикробные свойства представителей вида *Laetiporus sulphureus* (Fr.) Bond et Sing. // Усп. медицинской микологии. 2001. Т. 1. С. 313—315.

Тихонова О. В., Лурье Л. М., Ершова Е. Ю., Ефременкова О. В., Дудник Ю. В. Изучение глубинной культуры *Laetiporus sulphureus* // Современная микология в России. I съезд микологов (Москва 2002): Тез. докл. М., 2002. С. 257.

Ikekawa T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care // Int. J. Med. Mushr. 2001. N 3. P. 291—298.

Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review) // Int. J. Med. Mushr. 1999. N 1. P. 9—29.

Mizuno T., Saito H., Nishitoba T., Kawagashi H. Antitumor-active substances from mushrooms // Food Rev. Int. 1995. N 11. P. 23—61.

Tidke G., Rai M. Biotechnological Potential of Mushrooms: Drugs and Dye Production // Int. J. Med. Mushr. 2006. Vol. 8, N 4. P. 351—360.

Национальный технический университет Украины «КПИ»
Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины

Киев
larsa@ukrpost.net.

Поступила 26 VI 2007

S U M M A R Y

Cultural and morphological peculiarities of 4 strains *Laetiporus sulphureus* were studied in condition of submerged culture. The evaluation of potentialities of agricultural and processing industry' wastes as components of complex media has shown prospects of using such additions as soy-bean, pea and corn flours, starch, alder sawdust. Addition of soy-bean flour to the cultural medium of *L. sulphureus* was conducive for formation of filament mycelium and augmentation of biomass in submerged culture almost 2 times in comparison with the same exponents on the medium without additions. The drop of pH index from 6—7 to 2.2—2.3 has taken place in the process of *L. sulphureus* cultivation despite of the medium and additions.