

УДК 582.284

Л.П. Дзигун, О.А. Палюшок, О.М. Чуднівець

**ПІДБІР СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ БУРЯКОВОГО ЖОМУ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *LAETIPORUS SULPHUREUS***

In this survey the possibility of using sugar beet pulp extract as the basis of growth medium for the cultivation basidiomycetes *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill was evaluated. Positive results of evaluating the suitability of the medium based on this extract for cultivation on agar plates and in liquid media were obtained. Strain that is best adapted to the new source of nutrients was selected from three strains during a series of experiments. Component composition of nutrient medium to conduct further experiments with the selected strain was improved. Various wastes of different industries – sawdust, grape husks, wheat bran and tenderized pulp – were used for that. The best results are achieved by using of grape husks. Increasing the economic factor in 1,5 times was managed. Using the sawdust of different tree species is perspective because sulphur shelf is a species of bracket fungus. This experiment will allow increasing fungal biomass accumulation and reduce the cost of the process of growing.

**Keywords:** basidiomycete, *Laetiporus sulphureus*, cultivation on agar plates, submerged cultivation, sugar beet pulp, economic factor.

**Вступ**

Вищі базидіальні гриби – продуценти біологічно активних речовин різного призначення. До них належить дереворуйнівний гриб – трутовик сірчано-жовтий, грибні метаболіти якого представлені широким спектром різних класів хімічних речовин. Так, *Laetiporus sulphureus* здатний продукувати каротиноїди, які разом з іншими метаболітами проявляють антиоксидантну активність (що сприяє попередженню онкологічних і вікових пошкоджень клітин організму через перешкоджання окисненню фосфоліпідів мембран) і зменшують імовірність розвитку серцево-судинних захворювань [1–5].

Також встановлена антимікробна активність штамів *Laetiporus sulphureus* відносно грам-позитивних і грамнегативних бактерій. Проте цей гриб не інгібує розвиток молочнокислих бактерій, що дає змогу використовувати його як консервант молочних продуктів й одночасно з пробіотичними препаратами. Слід зазначити, що культуральні фільтрати мають бактеріостатичний ефект, а спиртові – бактерицидний. Крім того, водний екстракт базидіального гриба *Laetiporus sulphureus* інгібує репродукцію вірусу грипу А. Це важливо, адже щороку у світі на грип хворіють до 3,5 мільйона осіб, з них до 300–500 тис. випадків летальні [3, 5–9].

Здатність гриба сорбувати селен із живильного середовища робить перспективним його використання як харчової домішки. Лише органічний селен здатен засвоюватися організмом. Загальноновизнано, що селен є необхідним для життя мікроелементом. Він забезпечує функціо-

нування захисної глутатіонпероксидазної системи, входячи в активний центр глутатіонпероксидази, яка викликає руйнування надлишкових перекисів у організмі, захищає вітамін Е і ліпіди біологічних мембран, стимулює реакційну здатність SH-груп ферментів, сприяє нормальному формуванню м'язової тканини [10].

Зі сказаного вище випливає, що існує потреба в промисловому культивуванні гриба, що можливо при оптимізації та здешевленні умов вирощування. Одним із можливих шляхів досягнення цієї мети є використання дешевої сировини – відходів промисловості. Дослідники відзначали можливість використання різних целюлозовмісних відходів, серед яких як потенційне живильне середовище зарекомендував себе буряковий жом [11]. На цукрових заводах вихід жому становить 83 % від маси переробленого буряка. Основна маса жому представлена різними полісахаридами: клітковина – 26 %, пектин – 30 %, також білки – 8,5 %, нуклеїнові кислоти – 0,2 %, зольний компонент – 4,2–5,7 %. Це дає змогу використовувати його як компонент живильних середовищ, оскільки він забезпечує потреби грибів у поживних речовинах. Проте відзначається необхідність поліпшення компонентного складу середовища на основі бурякового жому [12, 13].

**Постановка задачі**

Мета роботи: оцінити можливість використання бурякового жому як живильного середовища та за необхідності збалансувати вміст поживних компонентів у рідкому живильному

середовищі на основі екстракту бурякового жому внесенням різноманітних природних домішок для максимального накопичення біомаси відносно спожитих цукрів.

### Матеріали і методи дослідження

Об'єктом досліджень було вибрано три штами вищого дереворуйнівного базидіоміцета *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Basidiomycota) – 1518, 1774, 1813 – з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Посівний матеріал вирощували в чашках Петрі на сусло-агарі за температури  $t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$  7 діб.

Твердофазове культивування здійснювали на сусло-агарі й агаризованому екстракті з бурякового жому. Для приготування сусло-агару використовували пивне сусло 6° Балінга з додаванням 20 г агар-агару на кожен літр сусла. Для приготування екстракту сухий гранульований жом екстрагували водопровідною водою у співвідношенні 1:9 упродовж 1 год на водяній бані. Екстракт відділяли фільтруванням. Вміст агар-агару для приготування твердого щільного середовища – 20 г/л.

Інокуляцію проводили міцеліальними дисками діаметром 5 мм у центр чашки Петрі. Інкубували 7 діб за температури  $t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$  у трьох повторностях. У ході культивування, протягом тижня, вимірювали діаметри культури у трьох напрямках. На основі цих даних розраховували лінійні швидкості радіального росту в міліметрах за добу. Для повного порівняння враховували культуральні особливості штамів у процесі росту на обох середовищах [14].

Поверхневе культивування здійснювали на екстракті бурякового жому, а також із додаванням стимулюючих агентів. Як додаткові компоненти в середовище вносили: тирсу, пшеничні висівки, виноградні вичавки, жом. Домішки додавали в кількості 1 % від об'єму екстракту. Середовища стерилізували автоклавуванням при 1 атм. упродовж 20 хв.

Інокуляцію проводили міцеліальними дисками діаметром 5 мм у колби з живильним середовищем. Інкубували у трьох повторностях до повного заростання поверхні середовища міцелієм за температури  $t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Для вихідних середовищ і культуральних рідин були визначені основні показники. Водневий показник вимірювали за допомогою рН-метра. Концентрацію редуруючих цукрів визначали феричіанідним методом [15]. Для аналізу нередукую-

чі цукри переводили в редукуючий стан у живильних середовищах кислотним гідролізом. Концентрацію білків встановлювали за допомогою методу Лоурі [14]. Кількість нарощеної біомаси встановлювали висушуванням до постійної маси міцелію гриба в сушильній шафі за температури  $105^\circ\text{C}$ . Для наочності порівнянь було розраховано економічний коефіцієнт [16].

### Результати і їх обговорення

При культивуванні штамів на агаризованих середовищах, а саме суслі й екстракті з бурякового жому, були відзначені такі відмінності культуральних ознак: на екстракті міцелій має менш насичений морквяний колір, повітряний міцелій не такий щільний, складається з тонших гіфів та утворює концентричні кола. Також, було встановлено, що кожен штам має свої особливості на всіх досліджуваних середовищах. Так, наприклад, штам 1518 має рожевий відтінок. Ростові характеристики штамів на досліджуваних агаризованих середовищах теж різнилися. Лінійна швидкість росту штамів наведена в табл. 1.

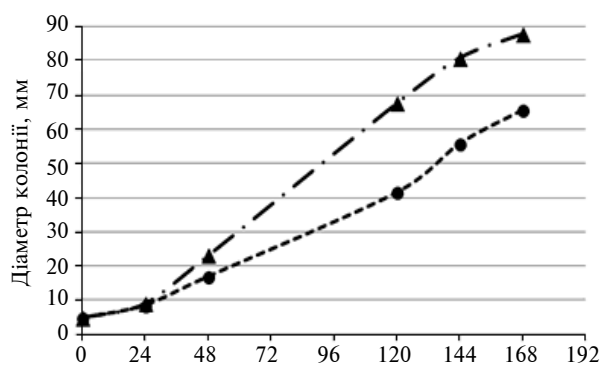
Таблиця 1. Лінійна швидкість росту штамів *Laetiporus sulphureus*, мм/добу

Штам	Живильне середовище	
	Сусло-агар	На основі бурякового жому
1518	$12,3 \pm 3,58$	$10,2 \pm 2,86$
1774	$11,6 \pm 4,7$	$10,8 \pm 1,94$
1813	$11,8 \pm 4,02$	$10,1 \pm 3,07$

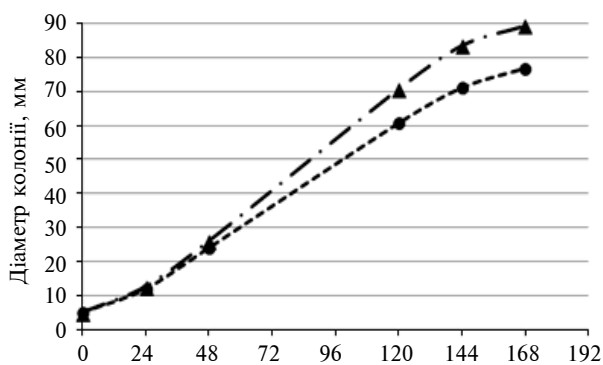
З даних табл. 1 видно, що на екстракті з бурякового жому швидкість росту на 7–17 % нижча порівняно з агаризованим суслем. Але культура росте більш рівномірно, як видно з динаміки росту культури, показаної на рисунку.

Наступним етапом було переведення культур на рідкі середовища. При поверхневому культивуванні штамів гриба на рідкому середовищі були отримані результати, наведені у табл. 2. Так, встановлено, що в процесі культивування відбувається закислення середовища всіма штамми до рН 2,3. Це явище, як відомо з праць інших дослідників, притаманне збудникам бурі гнилі, яким є дереворуйнівний гриб *Laetiporus sulphureus*, і пов'язане з синтезом у ході росту щавлевої кислоти, що призводить до зниження водневого показника [17]. Крім того, спостерігається підвищення кількості білка в культуральній рідині. Це пов'язано, оче-

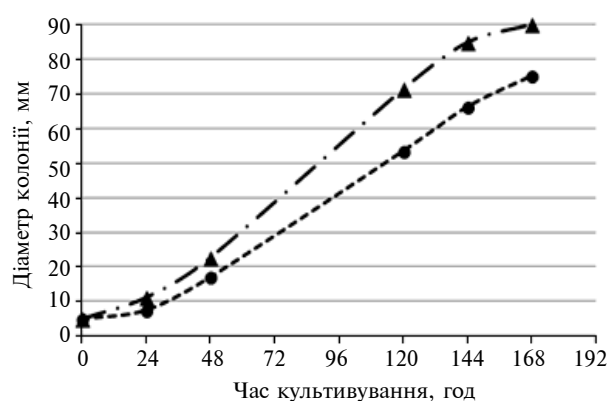
видно, з тим, що білкові компоненти – це ферменти, які здійснювали гідроліз нередукуючих цукрів до редукуючих. Підтвердженням цього є



а



б



в

Динаміка росту штамів *Laetiporus sulphureus* на агаризованих середовищах: а – штаму 1518, б – штаму 1813, в – штаму 1774; ▲ – сушло-агар, ● – середовище на основі бурякового екстракту

збільшення концентрації редукуючих цукрів на кінець культивування порівняно з вихідним середовищем (див. табл. 2).

Найкраще до росту на рідкому екстракті з бурякового жому адаптувався штаму 1813. Так, він мав за час культивування найбільше накопичення біомаси – 1,76 г/л, що на 11 і 20 % вище, ніж у штамів 1774 і 1518 відповідно. Найвищим для цього штаму був і економічний коефіцієнт 0,048, який на 15 і 25 % більший порівняно з цим же показником інших штамів. Тому для подальших досліджень був відібраний саме штаму 1813.

При вирощуванні штаму 1813 на середовищі, вдосконаленому внесенням домішок (тирса, пшеничні висівки, виноградні вичавки та жом), що поліпшили компонентний склад, були отримані результати, наведені в табл. 3. Вивчення росту штаму показало, що найбільшу кількість біомаси культура накопичувала на середовищі з додаванням виноградних вичавок  $8,0 \pm 0,8$  г/л. На середовищах з додаванням пшеничних висівок, тирси та жому цей показник був менше на 18, 24 і 27 % відповідно. Найменша кількість біомаси накопичувалась на середовищі без домішок –  $4,7 \pm 0,3$  г/л, що становить 60 % від накопичення біомаси на середовищі з додаванням виноградних вичавок.

Характерна ацидофільність дереворуйнівного гриба *Laetiporus sulphureus* як збудника бурі гнилі була зафіксована і в ході цього дослідження (див. табл. 3). Найбільше закислення середовища спостерігалось при додаванні тирси (рН 4,3), найменше – у середовищі з додаванням пшеничних висівок (рН 5,02).

У культуральній рідині також виявлено підвищення вмісту білка (див. табл. 3). Це можна пояснити необхідністю синтезу ферментів, що дають можливість грибу утилізувати вуглеводи, наявні в середовищі, а також тим, що у природі гриб паразитує на деревах, тому його конститутивні ферменти здатні розкладати целюлозу й інші полісахариди деревини.

На основі отриманих даних був розрахований економічний коефіцієнт, що виражає

Таблиця 2. Характеристика вихідного середовища і культуральної рідини при культивуванні штамів *Laetiporus sulphureus*

Показник	Вихідне середовище	Штами <i>L. sulphureus</i>		
		1518	1774	1813
рН	4,95	$2,93 \pm 0,41$	$2,34 \pm 0,08$	$2,37 \pm 0,08$
Редукуючі цукри, г/л	1,96	$10,96 \pm 0,14$	$11,53 \pm 0,24$	$11,24 \pm 0,6$
Білок, г/л	2,53	$2,39 \pm 0,14$	$3,12 \pm 0,19$	$2,81 \pm 0,3$

Таблиця 3. Основні показники живильних середовищ і біосинтетичні параметри штаму 1813 *Laetiporus sulphureus*

Параметр	Домішки				Без домішок
	Тирса	Пшеничні висівки	Виноградні вичавки	Жом	
Вихідне поживне середовище					
pH	4,3	5,02	4,13	4,48	4,49
Редукуючі цукри, г/л	13,14 ± 0,06	15,78 ± 0,05	18,53 ± 0,04	14,77 ± 0,05	14,34 ± 0,11
Білок, г/л	2,82 ± 0,1	2,7 ± 0,03	2,78 ± 0,05	2,56 ± 0,05	1,64 ± 0,1
Культуральна рідина					
pH	2,37 ± 0,06	3,78 ± 0,23	2,52 ± 0,04	2,98 ± 0,06	2,95
Редукуючі цукри, г/л	3,07 ± 0,11	4,4 ± 0,11	5,68 ± 0,07	3,55 ± 0,06	3,3 ± 0,01
Білок, г/л	2,86 ± 0,12	4,19 ± 0,19	3,74 ± 0,08	3,66 ± 0,19	2,78 ± 0,05

ефективність споживання вуглеводів середовища. Найбільший економічний коефіцієнт відзначений при використанні екстракту з бурякового жому з виноградними вичавками та тирсою 0,249 і 0,24 відповідно, що на 46 % більше того ж показника на середовищі без домішок. Внесення інших домішок практично не впливало на економічний коефіцієнт.

### Висновки

Була доведена можливість використання відходів цукрового виробництва, а саме бурякового жому, як основи рідкого живильного середовища для культивування вищого дереворуйнівного базидіального гриба *Laetiporus sulphureus*. Крім того, встановлено можливість поліпшення поживності середовища за рахунок внесення інших відходів сільського господарст-

ва та переробної промисловості, а саме використання тирси та виноградних вичавок. Також було показано позитивний вплив на ріст міцелію використання нового живильного середовища: економічна ефективність культивування зроста майже у 1,5 разу. Крім того, показано, що збільшення кислотності середовища у процесі росту незалежно від внесених у живильне середовище домішок зменшує можливість контамінації.

У подальшому доцільним є вивчення впливу тирси дерев різних порід на накопичення біомаси гриба, адже в літературі не достатньо матеріалів з цього питання. Також необхідно розглянути вплив макро- та мікроелементів на культивування базидіоміцета. Вивчення цих питань дасть змогу вирощувати *Laetiporus sulphureus* у більшій кількості, щоб реалізувати всі цінні властивості цього гриба.

### Список літератури

1. V. Langenberg, "Influence of using different sources of carotenoid", American Dietetic Association, vol. 96, no. 12, pp. 1271–1276, 1996.
2. Сімахіна Г.О. Функціональна роль каротиноїдів та особливості їх використання у харчових технологіях // Наукові праці НУХТ. – 2010. – № 33. – С. 45–48.
3. Дзигун Л.П. Лікарський ксилотрофний базидіоміцет *Laetiporus sulphureus* (bull.: fr.) Murrill – перспективний об'єкт біотехнології // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2011. – № 3. – С. 40–49.
4. Велигодська А.К., Федотов О.В. Порівняльна характеристика загального вмісту каротиноїдів у деяких видів базидіальних грибів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4. – С. 84–100.
5. Иванова И.Е. Изучение штаммов *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, ксилотрофов древостоев хвойных, и оценка перспектив их использования в биотехнологии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.01.06 "Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)". – М., 2013. – 24 с.
6. T. Okamura, "Cultural characteristics of *Laetiporus sulphureus*, producing an antithrombin substance", Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci., vol. 48, pp. 65–68, 2000.
7. Антимикробные свойства базидіального гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования / О.В. Ефременкова, О.В. Тихонова, Е.Ю. Ершова и др. // Успехи мед. микологии. – 2006. – № 7. – С. 280–283.
8. Экстракты базидіальных грибов подавляют репродукцию вируса гриппа птиц А(Н5N1) в экспериментах *in vitro* и *in vivo* / Е.И. Филиппова, А.С. Кабанов, М.О. Скарнович и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5.
9. Ингибитор репродукции вируса гриппа А на основе экстракта базидіального гриба *Laetiporus sulphureus*: Пат. 2475530 РФ: МПК C12N1/14, A61K36/06 /

- Т.В. Теплякова, Т.А. Косогова, Н.А. Мазуркова и др.; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор". – № 2011110826/10; Заявлено 22.03.2011; Опубл. 27.09.2012.
10. *Способ* получения селенсодержащего препарата биомассы *Laetiporus sulphureus* MZ-22: Пат. 2473679 РФ: МПК С12N1/14, А61К36/07 / Т.И. Громовых, О.Э. Салохина, А.И. Жаринов и др.; заявитель и патентообладатель Федеральное гос. бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет пищевых производств". – № 2011115880/10; Заявлено 22.04.2011; Опубл. 27.01.2013.
11. *Біосинтез* ендоглюканази термотолерантними мікроміцетами при рості на штучних та природних целюлозовмісних субстратах / Є.О. Омельчук, В.О. Красінко, В.Л. Айзенберг, С.О. Сирчин // Наукові доповіді Нац. ун-ту біоресурсів і природокористування України. – 2012. – № 7. – С. 10.
12. *Спічак В.В., Вратський А.М.* Сучасні напрямки використання та утилізації бурякового жому // Вісник цукровиків України. – 2010. – № 2. – С. 13–15.
13. *Кислухина О.В.* Биотехнологические основы переработки растительного сырья. – Каунас: Технология, 1997. – 182с.
14. *Методы* экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
15. *Изделия* кондитерские. Методы определения сахара: ГОСТ 5903–89. – Введ. 01.01.1991. – М.: Гос. агропром. комитет СССР 1989. – 23 с. – (Межгосударственный стандарт).
16. *Чайка А.В., Федотов О.В.* Культурально-морфологічні характеристики ксилотрофних базидіоміцетів у глинній культурі // Біологічний вісник МДПУ. – 2013. – № 1. – С. 19.
17. *Антимикробные* свойства базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования / О.В. Ефременкова, О.В. Тихонова, Е.Ю. Ершова и др. // Успехи мед. микологии. – 2006. – 7. – С. 280–283.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції  
12 лютого 2014 року