

Л.П. ДЗИГУН

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

пр-т Перемоги, 37, корпус 4, Київ, 03057, Україна
larsa@ukrpost.net

**КУЛЬТИВУВАННЯ
ДЕРЕВОРУЙНІВНОГО ГРИБА
LAETIPORUS SULPHUREUS (BULL.: FR.)
MURRILL (BASIDIOMYCOTA) НА РІДКИХ
КОМПЛЕКСНИХ СЕРЕДОВИЩАХ**

К л ю ч о в і с л о в а: *Laetiporus sulphureus*, рідкі середовища, біомаса, природні домішки, глибинне культивування

Базиціальні макроміцети широко відомі як джерело біологічно активних сполук різної хімічної природи, що значною мірою визначають харчову цінність грибів, а також їх лікарські властивості, зокрема імуномодуючу, антиоксидантну, онкостатичну, антимікробну, противірусну дію [1, 2, 8, 20—23]. Саме тому дуже важливим є розробка біотехнологічних методів їх вирощування в культурі.

Laetiporus sulphureus (Bull.: Fr.) Murrill (*Basidiomycota*) належить до екологічної групи дереворуйнівних базиціальних макроміцетів. Цей гриб привертає до себе увагу наявністю у плодових тілах і в міцелії каротиноїдів, які зумовлюють антиоксидантні, радіопротекторні та інші фармакологічні властивості [6, 7, 11, 15], а також харчовою цінністю молодих плодових тіл [3, 13].

Для культивування дереворуйнівних грибів успішно використовуються натуральні і синтетичні живильні середовища достатньо простого складу, що є важливою умовою для подальшої розробки технології їх промислового вирощування. Одна з вимог щодо промислових продуцентів — їхня здатність утилізувати дешеві недефіцитні джерела живлення. Такими субстратами можуть бути відходи сільського господарства та переробної промисловості, які є економічно вигідними компонентами рідких комплексних живильних середовищ [4, 5].

Особливо перспективним є глибинний метод культивування, оскільки він полегшує можливість виділення екзогенних продуктів метаболізму. Певні переваги має також використання міцелію, отриманого за умов глибинного культивування, як посівного матеріалу для переробки рослинних відходів.

Відомості про ріст *L. sulphureus* на різних рідких середовищах досить обмежені, це зумовлює необхідність дослідження його морфологічних та фізіологічних властивостей в умовах глибинного культивування, що і є метою даної роботи.

© Л.П. ДЗИГУН, 2008

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом вивчення були чотири штами *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Basidiomycota) (1518, 1772, 1773, 1774) з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Культури зберігали на агаризованому пивному суслі (СА) за температури +4 °С.

Мікробіологічні методи, які використовували у процесі цих досліджень, є загальноприйнятими для роботи з чистими культурами непатогенних мікроорганізмів, у тому числі міцеліальних грибів [14].

Ріст і динаміку змін основних ростових показників досліджували на рідких середовищах такого складу г/л [4, 18]:

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 дистильована до 1 л, рН 6,5.

2. Глюкоза — 10; соєве борошно — 15; NaCl — 3; крейда — 3 та вода водогінна до 1 л; рН 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 водогінна до 1 л; рН 7,0.

Як добавки до середовища 1 апробували подрібнені до порошокподібного стану виноградні та яблучні вичавки, лушпиння насіння соняшнику, вільхову та соснову тирси, соєве, горохове і кукурудзяне борошно, зародки пшениці, крохмаль, карбоксиметилцелюлозу. Їх вносили в колби у кількості 1 % від об'єму середовища перед стерилізацією.

Вихідний посівний матеріал готували шляхом пересіву культури у пробірку з СА. Отриманий за 7 діб міцелій пересівали в колби на проавтоклавоване синтетичне середовище 1 і культивували при 28 °С 6 діб поверхневим способом та 7 діб — на качалці з перемішуванням 120—150 об./хв. Після цього здійснювали пересів на досліджувані рідкі живильні середовища в кількості 10 об. %.

Дослідження проводили протягом 7—14 діб у трьох повторностях. Динаміку зміни основних ростових показників фіксували кожні 2 доби. Культури вирощували на качалці (120 об./хв.) при 28 ± 1 °С.

Для визначення концентрації біомаси міцелій гриба відокремлювали від культуральної рідини і висушували у сушильній шафі за температури 105 °С до постійної маси. Концентрацію біомаси розраховували у г сухої речовини на 1 л середовища.

Активну кислотність (рН) вимірювали за допомогою рН-метра кожні 2 доби.

Сухі речовини у культуральній рідині визначали ваговим методом. Культуральний фільтрат об'ємом 5 мл випаровували, а потім висушували в сушильній шафі при 105 °С до абсолютно сухої маси у попередньо зваженому бюксі. Концентрацію сухих речовин розраховували у г/л.

Вміст білка в культуральній рідині визначали за методом Шантерле і Полака [12].

Всі отримані експериментальні дані обробляли статистично [10].

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчення росту міцелію *L. sulphureus* у глибинній культурі показало, що найбільшу біомасу досліджувані штами накопичували на середовищах з додаванням соєвого (9,23—10,52 г/л), далі — горохового (7,33—7,54 г/л) та кукурудзяного (6,12—6,48 г/л) борошна, крохмалю (6,71—7,76 г/л) і вільхової тирси (5,84—6,12 г/л) (рис. 1). Дещо меншими були показники при культивуванні на середовищах з пшеничними зародками та сосною тирсою (5,90±0,54 та 5,95±0,13 г/л, відповідно). Найменша кількість біомаси у досліджуваних штамів виявилася на середовищах із карбоксиметилцелюлозою (1,26±0,10 г/л). Інші дослідники також відзначали, що найкращі ростові показники *L. sulphureus* спостерігаються при глибинному культивуванні на рідких живильних

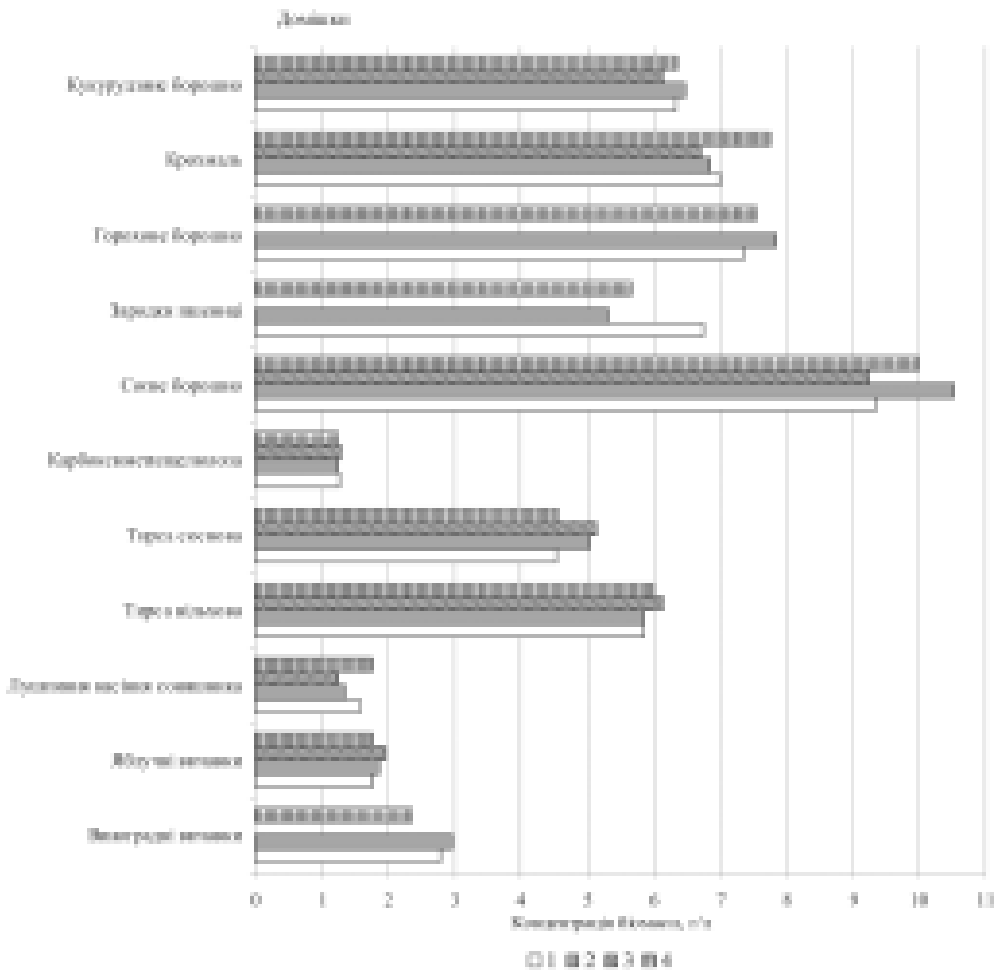


Рис. 1. Вплив домішок до середовища 1 на накопичення біомаси грибом *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill. Штами: 1 — 1774, 2 — 1773, 3 — 1772, 4 — 1518

Fig. 1. Effect of addition to medium 1 on augmentation of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill mushroom biomass. Strain: 1 — 1774, 2 — 1773, 3 — 1772, 4 — 1518

середовища з додаванням соєвого борошна і тирси листяних порід дерев [17—19]. Позитивний вплив на ріст таких домішок, як кукурудзяне борошно, соснова тирса, виноградні та яблучні вичавки і лушпиння насіння соняшнику, ми показали вперше.

Загалом отримані результати свідчать про подібність росту штамів *L. sulphureus* на середовищах з різними домішками, але спостерігаються і певні штамові відмінності. Так, штами *L. sulphureus* 1773 та 1518 краще росли на середовищах із соєвим борошном (10,52 та 10,00 г/л). У штаму 1774 достатньо суттєве накопичення біомаси зафіксували також на середовищі із зародками пшениці (6,74 г/л), а для штаму 1772 — з вільховою тирсою (6,12 г/л) порівняно з іншими штамами на тих самих середовищах (рис. 1). Проведений експеримент дав змогу встановити, що найсприятливішою домішкою для культивування штамів виду *L. sulphureus* є соєве борошно.

У наших експериментах відзначено суттєве зниження рН культуральної рідини у процесі росту досліджуваних штамів *L. sulphureus* на середовищах з різними домішками. Найбільшою мірою, порівняно з цим показником у вихідному середовищі, рН знижувалося при додаванні крохмалю та кукурудзяного

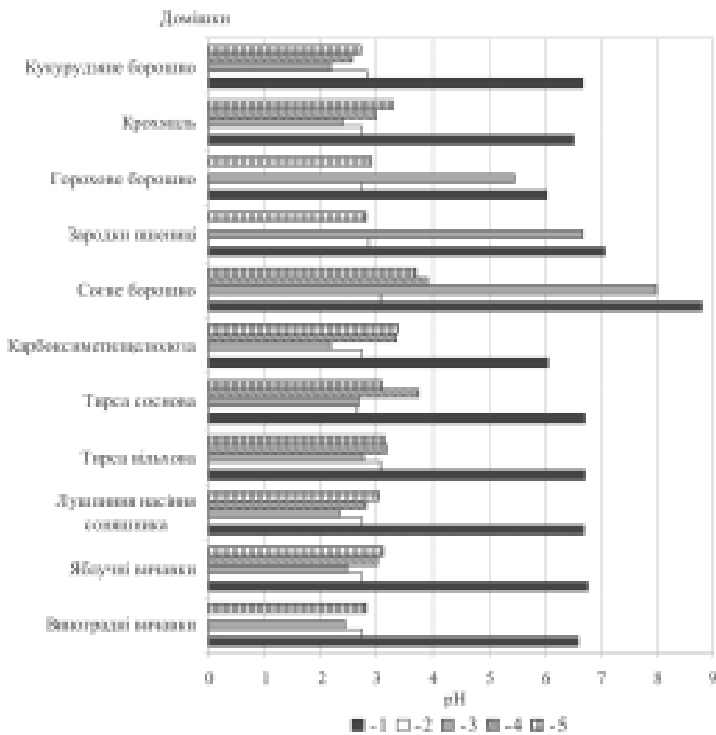


Рис. 2. Вплив домішок до середовища 1 на кінцеве значення рН культуральної рідини гриба *Laetiporus sulphureus*: 1 — вихідне середовище, 2 — штам 1774, 3 — штам 1773, 4 — штам 1772, 5 — штам 1518

Fig.2. Effect of addition to medium 1 pH index of cultural liquid of *Laetiporus sulphureus* mushroom: 1 — initial media, 2 — strain 1774, 3 — strain 1773, 4 — strain 1772, 5 — strain 1518

борошна. Для штаму *L. sulphureus* 1773 наприкінці культивування рН мало найнижчі значення — 2,38 та 2,17 (рис. 2). Для інших штамів на середовищах з домішками рН коливалося в межах від 2,6 до 5. Про суттєве зниження рН у процесі росту *L. sulphureus* на інших середовищах йшлося і у роботах ряду авторів [9, 19]. Зважаючи на відсутність відповідних відомостей, визначення оптимального значення рН середовища для росту штамів *L. sulphureus* потребує подальших досліджень.

Важливі характеристики можливого промислового продуцента можна визначити, вивчаючи зміни його ростових показників у динаміці. Для *L. sulphureus* такі дані в літературі практично відсутні. Для дослідження динаміки росту ми обрали штам 1518, який відзначався найстабільнішими показниками за всіх вищезазначених умов.

Зауважимо, що зазвичай *L. sulphureus* у глибинній культурі росте в анаморфній формі з утворенням термінальних та інтеркалярних хламідоспор [4], для формування міцелію йому необхідні центри росту, роль яких можуть відігравати різні природні домішки. Так, у дослідженого штаму 1518 у глибинній культурі спостерігали суттєві відмінності морфологічних ознак залежно від складу експериментального середовища. На середовищі 2 на 10—14 добу культивування утворювалися рівномірно розподілені по всьому об'єму культуральної рідини міцеліальні кульки яскравого жовтогарячого кольору діаметром 3—4 мм. На середовищі 3, попри багатший поживними компонентами склад, кульки не утворювалися. Протягом усього часу культивування міцеліальна маса була неоднорідною, і в культуральній рідині спостерігалися лише шматочки міцеліальних гіф та хламідоспори. Таке явище для *L. sulphureus* відзначали й інші дослідники [15].

Результати дослідження динаміки росту *L. sulphureus* 1518, наведені на рис. 3, засвідчують, що на середовищі 2, яке містило соєве борошно, накопичення біомаси було значно інтенсивнішим, ніж на середовищі 3 без домішок. Максимальний рівень накопичення біомаси на середовищі 2 зафіксували на 14-ту добу культивування — 9,45 г/л. На середовищі 3 цей показник на тому ж етапі культивування становив лише 5,62 г/л, що майже удвічі менше. Як видно з графіків, наведених на рис. 3, на середовищі 2 культура *L. sulphureus* 1518 майже досягла стаціонарної фази росту, а на середовищі 3 — лише стадії активного накопичення біомаси. Отже, внесення до живильного середовища домішок, зокрема соєвого борошна, значно збільшує накопичення біомаси і скорочує час культивування.

В експерименті було виявлено, що досліджуваний штам значно закислює обидва середовища і це може пояснюватися ацидофільністю гриба (рис. 3). Таке явище характерне для грибів-збудників бурої гнилі, до яких і належить *L. sulphureus*. Закислення культуральної рідини деякі автори пояснюють накопиченням щавлевої кислоти [9, 16, 19]. Значне зниження рН від 6—7 у вихідному живильному середовищі до 4—2 наприкінці культивування *L. sulphureus* можна вважати позитивним аспектом для подальшого вирощу-

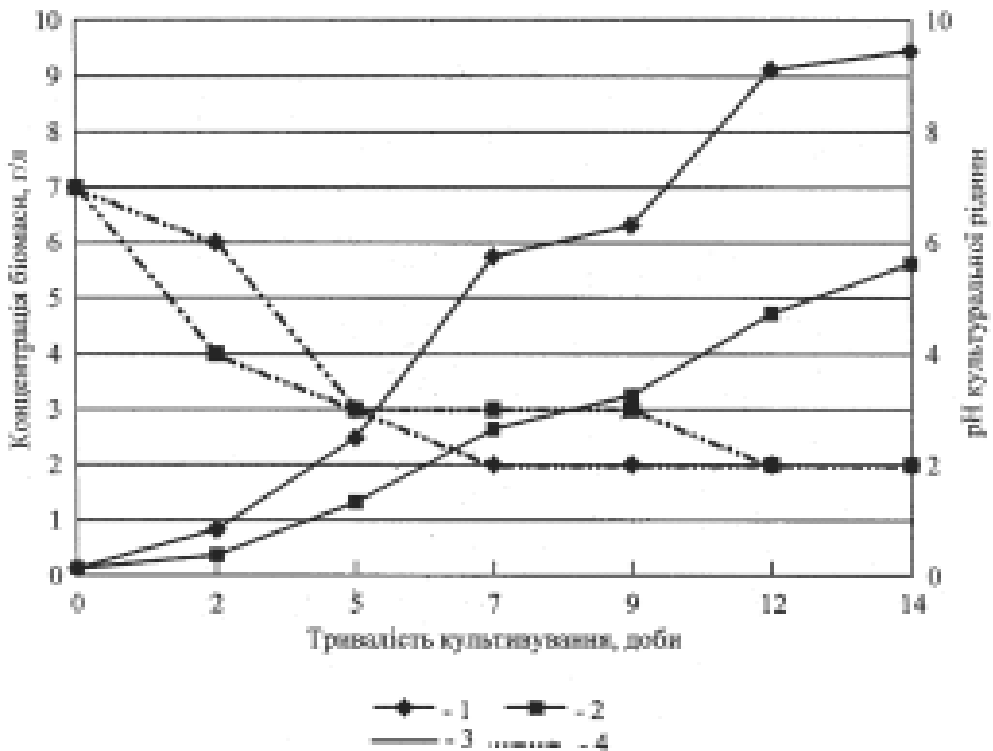


Рис. 3. Динаміка накопичення біомаси та зміни pH середовища у процесі глибинного культивування гриба *Laetiporus sulphureus* (штам 1518): 1 — середовище 2, 2 — середовище 3, 3 — динаміка накопичення біомаси, 4 — зміна pH культуральної рідини

Fig. 3. Dynamics of biomass augmentation and pH change of medium in the process of submerged cultivation of *Laetiporus sulphureus* (strain 1518): 1 — medium 2; 2 — medium 3; 3 — dynamics of biomass augmentation; 4 — pH change of cultural liquid

вання гриба, оскільки сприяє зниженню кількості можливих мікробних контамінантів, розвиток яких гальмується в кислому середовищі, тимчасом як гриб продовжує рости (рис. 3).

Важливим показником ефективності культивування є динаміка споживання грибом поживних компонентів середовища, комплексну зміну яких можна визначити за концентрацією сухих речовин, яка знижувалася при рості гриба на обох середовищах (рис. 4), проте різною мірою. Так, на середовищі 2 найбільш різке зменшення концентрації сухих речовин (майже у 4,5 раза порівняно з вихідним живильним середовищем) припадало на 5-ту добу культивування. На середовищі 3 це відбувалося на 2-гу добу, а вміст сухих речовин становить третину від кількості у вихідному живильному середовищі. Зниження концентрації сухих речовин корелює з накопиченням біомаси. Поряд з цим у культуральній рідині на обох середовищах зменшувалася і концентрація такої складової поживних компонентів, як загальний білок (рис. 4). Динаміка зміни його вмісту значною мірою повторювала динаміку зниження концентрації сухих речовин у культуральній рідині. На 10–12 добу

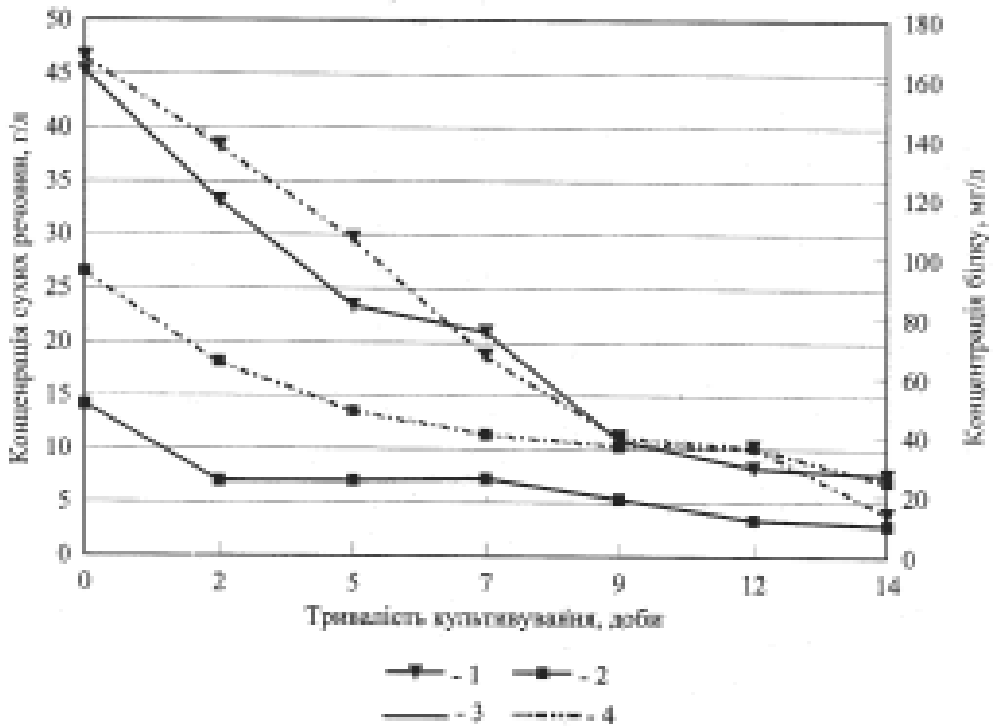


Рис. 4. Динаміка зміни концентрації сухих речовин та загального білка при культивуванні гриба *Laetiporus sulphureus* (штам 1518) на рідких живильних середовищах: 1 — середовище 2, 2 — середовище 3, 3 — зміна концентрації сухих речовин, 4 — зміна концентрації загального білка

Fig. 4. Dynamics of change of dry substance concentration and protein concentration in the process of *Laetiporus sulphureus* (strain 1518) cultivation on liquid medium: 1 — medium 2; 2 — medium 3; 3 — change of dry substance concentration; 4 — change of protein concentration

росту вміст білка був практично однаковим в обох середовищах — 3,9 мг/л. Це може свідчити, що білковий компонент середовищ також потрібний для росту гриба.

Висновки

Оцінка можливості використання відходів сільського господарства та переробної промисловості як компонентів комплексних живильних середовищ показала перспективність передусім таких домішок, як соєве, горохове та кукурудзяне борошно, крохмаль, вільхова тирса.

Додавання соєвого борошна до середовища культивування *L. sulphureus* сприяло формуванню нитчастого міцелію та збільшенню накопичення біомаси у глибинній культурі майже удвічі порівняно з цим показником на середовищі без домішок.

Значне зниження рН середовища (з 6,5–7,0 до 2,2–2,3) відбувалося у процесі росту *L. sulphureus* незалежно від складу використаних середовищ та домішок.

За час культивування для накопичення біомаси потрібні поживні компоненти середовищ, бо концентрація сухих речовин та білка за час культивування знизилася у 4,5 раза.

1. Бадалян С.М. Основные группы и терапевтическая значимость биоактивных метаболитов, образуемых макромицетами // Пробл. мед. микол. — 2000. — 3, № 1. — С. 16 — 23.
2. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микол. и фитопатол. — 2004. — 38, № 2. — С. 1—7.
3. Бондарцев А.С. Трутовые грибы Европейской части СССР и Кавказа. — М; Л.: АН СССР, 1953. — 1106 с.
4. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Отв. ред. И.А. Дудка. — Киев: Наук. думка, 1988. — 144 с.
5. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Под общ. ред. И.А. Дудки. — Киев: Наук. думка, 1983. — 312 с.
6. Гвоздкова Т.С., Мишин Л.Т., Черноок Т.В. и др. Глубинный мицелий ксатофиллсодержащего гриба *Laetiporus sulphureus* — основа новой биологически активной добавки // Усп. мед. микол. — 2004. — 3. — С. 218—220.
7. Гвоздкова Т.С., Пленина Л.В., Капич А.Н. и др. Лекарственный базидиальный гриб *Laetiporus sulphureus* — источник биологически активных соединений // Персп. исп. лек. грибов при решении мед.-экол. проблем: Мат-лы междунар. науч.-практ. конф. (Киев, сентябрь, 2004). — Киев, 2004. — С. 18—20.
8. Денисова Н.П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. — СПб: Изд. СПбГМУ, 1998. — 59 с.
9. Ефременкова О.В., Тихонова О.В., Ершова Е.Ю. и др. Антимикробные свойства базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования // Усп. мед. микол. — 2006. — 7. — С. 280—283.
10. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной биологии. — М.: Наука, 1984. — 424 с.
11. Капич А.Н., Гвоздкова Т.С., Квачева З.Б. и др. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования // Усп. мед. микол. — 2004. — 3. — С. 146—148.
12. 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.
13. Маслова Р.А. Рост и развитие некоторых афилофоровых грибов на различных питательных средах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1972. — 25 с.
14. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
15. Озерова Н.С. Экологические особенности ксилотрофных базидиомицетов родов *Laetiporus* Murrill и *Ganoderma* P. Karst. Пензенской области: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Москва, 2006. — 23 с.
16. 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. біял. навук. — 2002. — № 3. — С. 112—114.
17. Сорока О.Н., Гвоздкова Т.С., Залашко М.В. Каротиногенез гриба *Laetiporus sulphureus* M131 на различных питательных субстратах // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук. — 2002. — № 4. — С. 113—115.
18. Тихонова О.В., Ершова Е.Ю., Лурье Л.М. и др. Антимикробные свойства представителей вида *Laetiporus sulphureus* (Fr.) Bond et Sing. // Усп. мед. микол. — 2001. — 1. — С. 313—315.
19. Тихонова О.В., Лурье Л.М., Ершова Е.Ю. и др. Изучение глубинной культуры *Laetiporus sulphureus* // Совр. микол. в России: I съезд микологов (Москва, 2002): Тез. докл. — М., 2002. — С. 257.

20. *Ikekawa T.* Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care // *Int. J. Med. Mushr.* — 2001. — № 3. — P. 291—298.
21. *Mizuno T.* The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review) // *Int. J. Med. Mushr.* — 1999. — № 1. — P. 9—29.
22. *Mizuno T., Saito H., Nishitoba T., Kawagashi H.* Antitumor-active substances from mushrooms // *Food Rev. Int.* — 1995. — **11**. — P. 23—61.
23. *Wasser S.P., Sytnik K.M., Buchalo A.S. and Solomko L.F.* Medicinal mushrooms: past, present and future // *Укр. ботан. журн.* — 2002. — **59**, № 5. — С. 499—523.

Рекомендує до друку
А.С. Бухало

Надійшла 17.05.2007

Л.П. Дзыгун

Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩЕГО ГРИБА *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.: FR.) MURRILL (BASIDIOMYCOTA) НА ЖИДКИХ КОМПЛЕКСНЫХ СРЕДАХ

Исследованы культуральные и морфологические особенности четырех штаммов *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill в условиях глубинной культуры. Оценка возможности использования отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности в качестве компонентов комплексных питательных сред показала перспективность таких добавок, как соевая, гороховая и кукурузная мука, крахмал, ольховые опилки. Добавление соевой муки к среде для культивирования *L. sulphureus* способствовало формированию нитчатого мицелия и увеличению накопления биомассы в глубинной культуре почти в 2 раза в сравнении с этим же показателем на среде без добавок. Снижение pH среды от 6,5—7,0 до 2,2—2,3 происходило в процессе культивирования *L. sulphureus* независимо от состава среды и добавок.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Laetiporus sulphureus*, жидкие среды, биомасса, природные добавки, глубинное культивирование

L.P. Dzygun

National Technical University of Ukraine «Kiev Polytechnical Institute»

CULTIVATION OF WOOD-DESTROYING FUNGUS *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.: FR.) MURRILL (BASIDIOMYCOTA) ON LIQUID COMPLEX MEDIA

There were studied cultural and morphological peculiarities of 4 strains of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill in condition of submerged culture. Evaluation of potentialities of agricultural and processing industrial wastes using as components of complex media has shown prospects of using such additions as soybean, pea and corn flours, starch, and alder sawdust. Addition of soybean flour to the cultural medium of *L. sulphureus* was conducive for formation of filament mycelium and augmentation of biomass in submerged culture almost twice as compared to the same datum 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 cultivation of *L. sulphureus* despite of the medium and additions.

K e y w o r d s: *Laetiporus sulphureus*, liquid medium, biomass, natural additions, submerged cultivation.