

УДК 582.284.3

В.М. Ліновицька, А.С. Бухало, О.М. Дуган

## ПІДБІР УМОВ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ *GRIFOLA FRONDOSA* ЯК ОСНОВИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ ОТРИМАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

The paper investigates the influence of sources of carbon and nitrogen, pH and components of nutrient mediums (beer wort, molasses, corn extract, peptone, extract of yeasts) on the accumulation of biomass and exopolysaccharides under cultivation of higher basidiomycetes mushroom of *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray. Crucially, we propose complex nutrient mediums with glucose, ammonium nitrate, corn extract and molasses favorable for biosynthesis of exopolysaccharides and biomass.

### Вступ

Вищі базидіальні гриби використовуються людиною з давніх часів як безпосередньо для харчування, так і в народній медицині. У наш час практичне значення різних видів грибів цієї групи полягає в отриманні їстівних плодових тіл, а також ряду біологічно активних сполук харчового, лікувально-профілактичного та промислового призначення. Так, на основі базидіоміцетів створено унікальні протипухлинні препарати: шизофілан, грифолан, лентинан, коріолан тощо [1, 2]. Також відомо про отримання ферментів, лектинів, полісахаридів та інших органічних сполук з різноманітними властивостями саме з вищих базидіальних грибів. Тому дослідження, які стосуються розширення галузі використання різних видів базидіоміцетів, не припиняються.

Одним із об'єктів, перспективних з цієї точки зору, є базидіоміцет *Grifola frondosa* (грифола кучерява, маїтаке), який є джерелом лікувально-профілактичних протеоглюканових і глюканових комплексів з протипухлинною, імуностимулюючою, антибактерійною, антивірусною (в тому числі проти ВІЛ) дією, а також має здатність до регулювання кров'яного тиску та антидіабетичні й антиоксидантні властивості [1–9]. Як і у інших базидіальних грибів, основною біологічно активною речовиною препаратів на основі *G. frondosa* є полісахариди. У маїтаке були виявлені  $\alpha$ - і  $\beta$ -D-глюкани з переважанням  $\beta$ -D-глюканів. Виділені з міцелію, плодових тіл і культурального фільтрату різні фракції полісахаридів досліджуються і використовуються під різними назвами: грифолан, D-глюкан, MD-фракція, Grifon-D тощо [3, 4, 7].

Крім того, з плодових тіл і міцелію грифולי було виділено та досліджено N-ацетилгалактозамін – специфічний лектин – і ряд протеолітичних ферментів [10, 11].

Основним методом промислового виробництва продуктів з *G. frondosa* є отримання плодових тіл твердофазовим культивуванням з подальшим виділенням з них та очищенням певних цільових продуктів. Але більш технологічним та ефективним є виробництво грибних біологічно активних сполук в умовах глибокого культивування.

Інформації про особливості глибокого культивування грифоли в літературі наведено мало. Як середовища в основному використовувались сольовий розчин з додаванням глюкози – 20–45 г/дм<sup>3</sup> (або рідше сахарози – 20–30 г/дм<sup>3</sup>) і різноманітних джерел ростових факторів – пептон, дріжджовий екстракт, картопляний відвар, мальц-екстракт [12–16]. Але наведені авторами відомості не завжди повні й іноді суперечливі. Тому існує необхідність у подальших поглиблених дослідженнях *G. frondosa* в різних умовах культивування як в напрямі розширення теоретичних знань стосовно біології цього базидіоміцета, так і з точки зору створення нових вітчизняних біотехнологій отримання різноманітних біологічно активних речовин (БАР), в першу чергу лікувально-профілактичного призначення.

### Постановка задачі

Мета дослідження: оцінка фізіолого-біохімічних особливостей різних штамів вищого базидіоміцета *Grifola frondosa* залежно від умов глибокого культивування та підбір компонентів поживних середовищ для створення біотехнологій виробництва фізіологічно активної міцеліальної біомаси як джерела БАР.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були 4 штами *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray, отримані з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Глибинне культивування проводилося в колбах Ерленмеєра на 100 або 250 мл в умовах постійного перемішування за допомогою орбітальної качалки (60–70 об/хв) при температурі  $28 \pm 1$  °С. Середовища інокулювались попередньо отриманою фізіологічно активною глибинною культурою в об'ємній кількості 10 %.

Як мінеральна основа для середовищ використовувалася сольовий розчин такого складу:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 3 г/дм<sup>3</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г/дм<sup>3</sup>;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1 г/дм<sup>3</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,6 г/дм<sup>3</sup> [17]. При цьому для різних варіантів досліджень як ростові фактори і додаткові джерела азоту та вуглецю вносилися в кількості, еквівалентній 20 г/дм<sup>3</sup> глюкози, один із таких компонентів: пивне сусло, брякова меляса, кукурудзяний екстракт (КЕ), пептон, екстракт кормових дріжджів (ЕКД). Контрольне середовище містило глюкозу.

Протягом культивування раз на добу здійснювався відбір проб культуральної рідини. В пробах визначалися рівень рН, вміст біомаси, редуруючих речовин та екзополісахаридів.

Рівень накопичення біомаси визначався ваговим методом висушуванням міцелію до постійної маси при температурі  $105 \pm 1$  °С [18]. Вміст редууючих речовин у культуральній рідині визначався фериціанідним методом [19].

Для визначення концентрації екзополісахаридів спочатку здійснювалися осадження 5 мл культуральної рідини з використанням 10 мл 96 %-ного етанолу та відстоювання протягом доби при температурі  $4 \pm 1$  °С, після чого осад відокремлювався центрифугуванням упродовж 25 хв зі швидкістю 6–7 тис. об/хв і розчинявся в 5 мл гарячої дистильованої води. Потім відбиралися 2 мл розчину, в якому визначалася кількість екзополісахаридів фенол-сірчанним методом [20].

Для визначення найсприятливіших для накопичення біомаси та екзополісахаридів джерел вуглецю використовувалося те ж саме мінеральне середовище, до якого як єдине джерело вуглецю, в кількості еквівалентній 20 г/дм<sup>3</sup> глюкози, додавалися інулін, ксилоза, лактоза, мальтоза, маніт, крохмаль, сахароза, фруктоза. Визначення кращих джерел азоту здійснювалося на середовищі такого складу: глюкоза – 20 г/дм<sup>3</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г/дм<sup>3</sup>;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1 г/дм<sup>3</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,6 г/дм<sup>3</sup>, до якого як джерело азоту (в еквіваленті 3 г/дм<sup>3</sup>  $\text{NaNO}_3$ ) додавалися: гістидин, лейцин, лізин, триптофан, пептон,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Вплив рівня рН на накопичення біомаси та екзополісахаридів визначався на сольовому середовищі з додаванням глюкози (30 г/дм<sup>3</sup>), в

якому зміною концентрації  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  і  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  створювалися буферні розчини зі значенням рН від 4,6 до 8,1 [18].

### Результати і їх обговорення

На першому етапі досліджень визначався вплив різних джерел вуглецю та азоту на ріст штамів *G. frondosa* (рис. 1, 2). Для росту всіх штамів *G. frondosa* кращими джерелами вуглецю були глюкоза і крохмаль. Так, максимальна кількість міцеліальної біомаси спостерігалася у штаму 962 –  $1,63 \pm 0,01$  і  $1,48 \pm 0,06$  г/дм<sup>3</sup> відповідно.

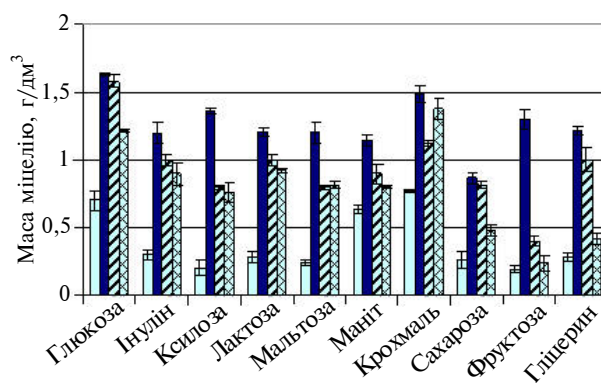


Рис. 1. Накопичення міцеліальної біомаси штамами *Grifola frondosa* на середовищах з різними джерелами вуглецю (7 доба): □ – штаму 332; ■ – штаму 962; ▨ – штаму 1790; ▩ – штаму 1794

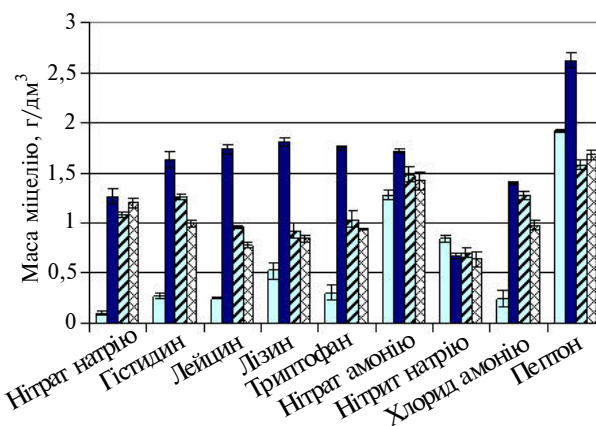


Рис. 2. Накопичення міцеліальної біомаси штамами *Grifola frondosa* на середовищах з різними джерелами азоту (7 доба): □ – штаму 332; ■ – штаму 962; ▨ – штаму 1790; ▩ – штаму 1794

Кращими джерелами азоту для *G. frondosa* був пептон – накопичення міцеліальної біомаси від  $1,58 \pm 0,05$  (штаму 1790) до  $1,92 \pm 0,2$  г/дм<sup>3</sup> (штаму 332). Серед неорганічних джерел азоту найсприятливішим виявився нітрат амонію (від  $1,28 \pm 0,05$  до  $1,71 \pm 0,02$  г/дм<sup>3</sup> у 332 і 962 штамів відповідно).

Зауважимо, що сприятливі для накопичення біомаси штамми *G. frondosa* глюкоза, пептон і нітрат амонію є поширеними компонентами рідких та щільних поживних середовищ і найчастіше застосовуються для культивування ксилотрофних вищих базидіоміцетів, у тому числі грифולי [12–16].

Однією з найважливіших характеристик культур є динаміка накопичення біомаси та певних цільових метаболітів. Тому для встановлення особливостей біосинтезу екзополісахаридів і біомаси в часі було проведено культивування штамів *G. frondosa* 332, 962, 1790 і 1794 на середовищі з 20 г/дм<sup>3</sup> глюкози та додаванням як джерела ростових факторів 2% пивного сусла. Виявлено, що найбільш активна (логарифмічна) фаза росту припадала для цих штамів на 24–48 години культивування, а максимальне накопичення біомаси – на п'яту–шосту добу становило від  $4,68 \pm 0,28$  (штам 1794) до  $5,69 \pm 0,24$  г/дм<sup>3</sup> (штам 332) (рис. 3).

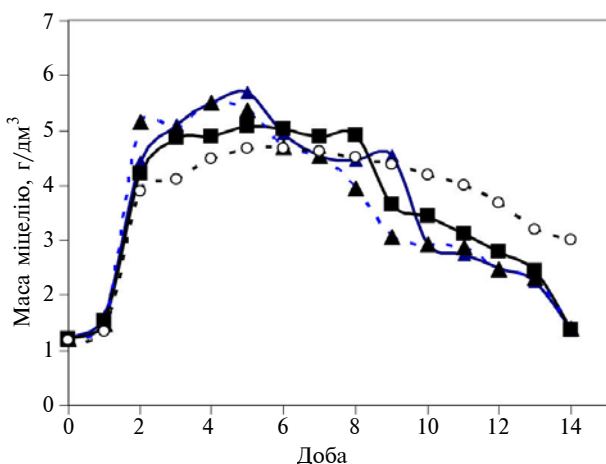


Рис. 3. Динаміка накопичення біомаси штамми *Grifola frondosa* в глибинній культурі: ▲ – штам 332; ▲ – штам 1790; ■ – штам 962; ○ – штам 1794

Оскільки основними біологічно активними речовинами, які отримуються з *G. frondosa*, є різні фракції полісахаридів (хоча й отриманих в основному з базидіом), то для подальшого вивчення та підтвердження лікувально-профілактичної дії було визначено динаміку концентрації екзополісахаридів, що секретуються глибинним міцелієм. Найбільша концентрація екзополісахаридів у всіх штамів становила  $1,24$ – $1,80$  г/дм<sup>3</sup> на п'яту–шосту добу культивування (рис. 4).

Ще одним фактором, який впливає на рівень продукування метаболітів і біомаси, є рН середовища. Дослідження впливу кислотності на накопичення біомаси та екзополісахаридів

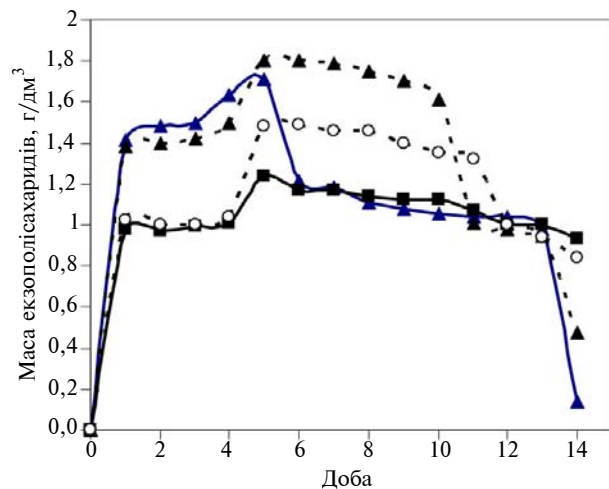


Рис. 4. Динаміка накопичення екзополісахаридів штамми *Grifola frondosa* в глибинній культурі: ▲ – штам 332; ▲ – штам 1790; ■ – штам 962; ○ – штам 1794

для штамів *G. frondosa* проводилися на синтетичному поживному середовищі з глюкозою (30 г/дм<sup>3</sup>) при різних вихідних значеннях рН (рис. 5, 6). В результаті було виявлено штамові особливості культур та визначено, що більшому виходу біомаси, так само, як і отриманню більшої кількості екзополісахаридів, для штамів 332, 962 і 1794 сприяє рівень рН = 5,4–6,0, для штаму 1790 – рН = 6,8. Таким чином, рівень рН середовищ, призначених для отримання біомаси та екзополісахаридів, може бути однаковим.

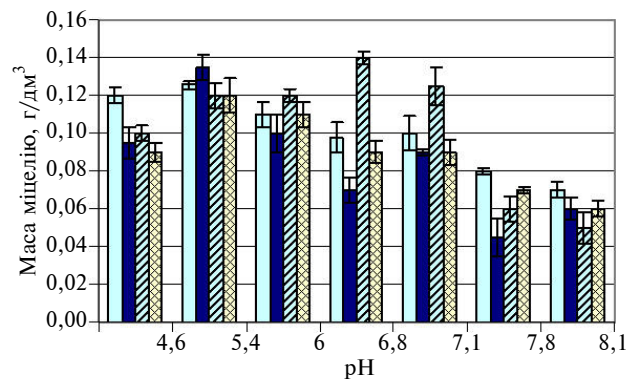


Рис. 5. Накопичення міцеліальної біомаси штамми *Grifola frondosa* на середовищах з різними вихідними значеннями рН (7 доба): □ – штам 332; ■ – штам 962; ▨ – штам 1790; ▩ – штам 1794

Оскільки комплексні середовища, з одного боку, є більш сприятливими для росту та отримання біологічно активних метаболітів з грибів, ніж синтетичні, а з іншого – є відносно дешевими, то на наступному етапі досліджень визначалися особливості біосинтетичної активності і нако-

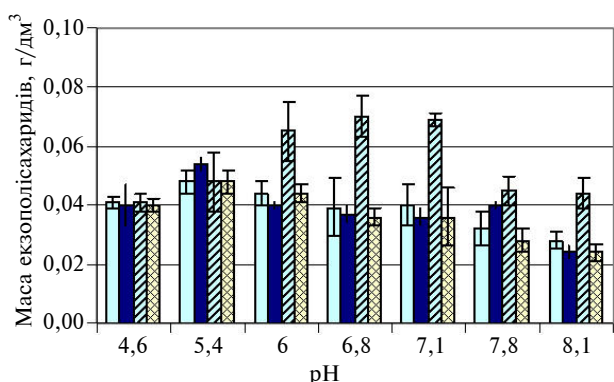


Рис. 6. Накопичення екзополісахаридів штамами *Grifola frondosa* на середовищах з різними вихідними значеннями рН (7 доба): □ – штам 332; ■ – штам 962; ▨ – штам 1790; ▩ – штам 1794

пичення біомаси для штамів *G. frondosa* на п'яти комплексних рідких середовищах. У результаті було виявлено, що найбільша кількість біомаси спостерігається у штамів на середовищах з пептоном і КЕ (рис. 7). Так, штами 962 і 1790 накопичували  $5,52 \pm 0,54$  і  $5,57 \pm 0,47$  та  $4,25 \pm 0,08$  і  $3,84 \pm 0,16$  г/дм<sup>3</sup> міцеліальної біомаси відповідно. Найгіршими середовищами були контрольне (без додаткових компонентів) та із суслом.

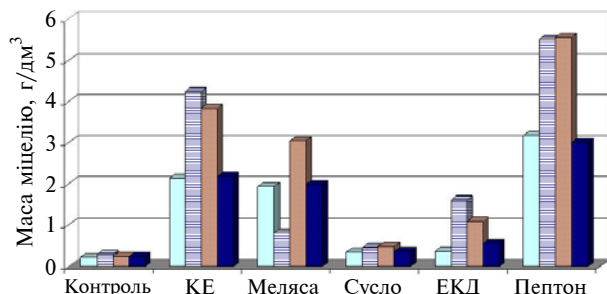


Рис. 7. Накопичення біомаси штамами *Grifola frondosa* на комплексних поживних середовищах (10 доба): □ – штам 332; ■ – штам 962; ▨ – штам 1790; ▩ – штам 1794

Визначення накопичення екзополісахаридів на комплексних поживних середовищах (рис. 8) показало, що їх максимальна кількість виявляється у *G. frondosa* на середовищах з м'ясою або пептоном ( $2,8 \pm 0,2$  і  $3,4 \pm 0,4$  г/дм<sup>3</sup> відповідно). Найменшу активність по накопиченню екзополісахаридів досліджувані штами виявляли на середовищах з суслом або глюкозою.

При культивуванні на комплексних середовищах також було визначено динаміку рН. Помітні зміни спостерігалися тільки в середовищі з пептоном, рівень рН якого зменшувався з 6,8 до 4,5–5,0. В інших середовищах значення рН практично залишалося без змін і становило залежно від складу середовища 4,5–7,0.

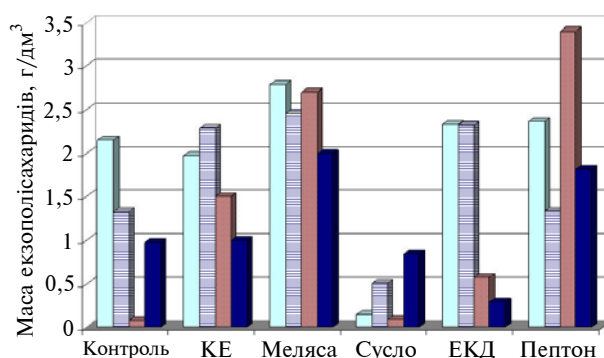


Рис. 8. Біосинтез екзополісахаридів штамами *Grifola frondosa* на комплексних поживних середовищах (10 доба): □ – штам 332; ■ – штам 962; ▨ – штам 1790; ▩ – штам 1794

Результати дослідження вмісту в культуральному фільтраті редуруючих речовин (РР) при культивуванні на комплексних поживних середовищах показали, що основними тенденціями динаміки споживання цих сполук є поступове зниження їх кількості в культуральній рідині для всіх штамів *G. frondosa* на всіх середовищах, крім середовища з пептоном, де спочатку спостерігається підвищення кількості РР протягом перших трьох діб культивування. Нерівномірне зменшення концентрації РР у середовищі, тобто деяке тимчасове збільшення вмісту РР при культивуванні штамів *G. frondosa*, пояснюється різним складом поживних середовищ і розкладом їх компонентів у декілька етапів, при цьому вміст цукрів може підвищуватися.

Отже, особливості динаміки накопичення біомаси та екзополісахаридів базидіоміцетом *G. frondosa* залежать, в першу чергу, від складу середовища і пов'язані з наявністю речовин-індукторів та хімічною природою сполук, що є джерелами вуглецю й азоту для гриба.

## Висновки

У результаті проведених досліджень росту та біосинтетичної активності вищого базидіального гриба *Grifola frondosa* на рідких середовищах різного складу встановлено сприятливі для накопичення біомаси джерела вуглецю (глюкоза та крохмаль) і азоту (пептон та нітрат амонію).

При визначенні динаміки накопичення біомаси було встановлено, що логарифмічна фаза росту припадає для всіх штамів на 24–48 години, а максимальне накопичення біомаси – на п'яту–шосту добу культивування. Найбільша концентрація екзополісахаридів у всіх штамів становила  $1,24$ – $1,80$  г/дм<sup>3</sup> на п'яту–шосту добу культивування.

Визначено, що більшому виходу біомаси, так само, як і отриманню екзополісахаридів, сприяє рівень рН = 5,4–6,0 для штамів 332, 962, 1794 і рН = 6,8 для штаму 1790.

Культивування на комплексних поживних середовищах дало змогу встановити, що найбільша кількість біомаси спостерігається у штамів на середовищі з пептоном і КЕ (до  $5,57 \pm 0,47$  г/дм<sup>3</sup> міцеліальної біомаси), а найбільша концентрація екзополісахаридів – на середовищах з мелясою або пептоном ( $2,8 \pm 0,2$  і  $3,4 \pm 0,4$  г/дм<sup>3</sup> відповідно).

Виявлено незначну зміну рівня рН протягом культивування на сприятливих для продукування біомаси та екзополісахаридів середовищах з кукурудзяним екстрактом і мелясою.

Для подальших біотехнологічних досліджень рекомендовано штамми-продуценти *G. frondosa* 962 і 1790, що мають досить високий рівень накопичення екзополісахаридів і біомаси, та запропоновано сприятливі для цього комплексні поживні середовища з глюкозою, нітратом амонію, кукурудзяним екстрактом і мелясою.

1. Wasser S.P. Medicinal mushrooms: ancient traditions, contemporary knowledge and scientific enquiries // Intern. Journal of Medicinal Mushrooms. – 2007. – 9, N 3-4. – P. 187–188.
2. Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Julich W.-D. The Pharmacological Potential of Mushrooms // eCAM. – 2005. – 2, N 3. – P. 285–299.
3. Zhou C., Wasser S.P. Medicinal value of culinary-medicinal maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F.Gray (Aphyllophoromycetidae). Review // Intern. Journal of Medicinal Mushrooms. – 2004. – 6, N 4. – P. 287–313.
4. Bartuv-Tal J., Mahajna J.A., Wasser S.P., Nevo E. Secondary metabolites from edible and medicinal mushrooms as potential therapeutics for colon cancer // Book of abstracts the 5<sup>th</sup> International Medicinal Mushroom Conference, Nantong, China, 5–8<sup>th</sup> September. – Nantong, 2009. – P. 194–195.
5. Wei S., Van Griensven L.J.L.D. Pro- and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts // Intern. Journal of Medicinal Mushrooms. – 2008. – 10, N 4. – P. 315–324.
6. Jong Suk Lee, Su-Young Park, Dinesh Thapa, Mi Kyoung Choi et al. *Grifola frondosa* water extract alleviates intestinal inflammation by suppressing TNF- $\alpha$  production and its signaling // Exp. Mol. Med. – 2010. – 42, N 2. – P. 143–154.
7. Kodama N., Murata Y., Nanba H. Administration of a polysaccharide from *Grifola frondosa* stimulates immune function of normal mice // J. Med. Food. – 2004. – 7, N 2. – P. 141–145.
8. Deng G., Lin H., Seidman A et al. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects // J. Cancer. Res. Clin. Oncol. – 2009. – 135. – P. 1215–1221.
9. Smith J.E., Rowan N., Sullivan R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities // Biotechnology Letters. – 2002. – 24, N 22. – P. 1839–1845.
10. Степанова Л.В., Бурьгин Г.Л., Маторя Л.Ю. и др. Изучение иммунохимических свойств и локализации лектина базидиомицета *Grifola frondosa* (Dicks : Fr.) S.F. Gray // Микробиология. – 2009. – 78, № 2. – С. 236–241.
11. Suzuki N., Nishibori K., Oodaira Y. et al. *Grifolisin*, a member of the sedolisin family produced by the fungus *Grifola frondosa* // Phytochemistry. – 2005. – 66, N 9. – P. 983–990.
12. Zhou Changyan, Qian Guo, Yun Qin Bai, Yan Yang. A Study of the Submerged Fermentation of the Mycelium of the Medicinal Mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray // Intern. Journal of Medicinal Mushrooms. – 2001. – 3. – P. 252.
13. Kim S.W., Hwang H.J., Park J.P et al. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media // Letters in Applied Microbiology. – 2002. – 34. – P. 56–61.
14. Lomberh M.L., Solomko E.F., Buchalo A.S., Kirchhoff B. Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures // 4<sup>th</sup> Int. Confer. "Mushroom Biology and Mushroom Products": Proc. – Cuernavaca (Mexico), 2002. – P. 367–377.
15. Bum Chun Lee, Jun Tae Bae, Hyeong Bae Pyo et al. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* // Enzyme and Microbial Technology. – 2004. – 35, N 5. – P. 369–376.
16. Berovic M., Svagelj M., Boh B., Wraber B. Submerged and solid cultivation of antitumor extra and intracellular fungal polysaccharides of *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* // Book of abstracts the 5<sup>th</sup> Intern. Medicinal Mushroom Conference, Nantong, China, 5–8<sup>th</sup> September. – Nantong, 2009. – P. 37–39.
17. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.
18. Методы экспериментальной микологии: Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. – К.: Наук. думка, 1982. – 562 с.
19. Изделия кондитерские. Методы определения сахара ГОСТ 5903–89 [Введен 1991-01-01]. – М.: Гос. агропромышленный комитет СССР 1989. – 23 с. – (Межгосударственный стандарт).
20. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – К.: Наук. думка, 2006. – 238 с.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції  
4 лютого 2011 року