

СТАТЬИ

УДК 582.284:57.083.13:678.048

**УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ
БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ РОДА LENTINUS,
ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

¹Ананьева Е.П., ¹Гурина С.В., ²Псурцева Н.В.

¹Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург,
e-mail: svetlana.gurina@pharminnotech.com, elena.ananieva@pharminnotech.com;

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: nadyapsu@mail.ru

Исследование посвящено изучению особенностей культивирования грибов базидиомицетов и определению биологической активности их метаболитов. В результате скрининговых экспериментов по культивированию из шести штаммов исследуемых базидиомицетов были отобраны два штамма *Lentinus substrictus* (синоним *Polyporus ciliatus*). Они превосходили остальные культуры по скорости роста, ферментативной активности и уровню накопления биомассы мицелия и показателям, характерным для многих видов базидиальных грибов лакказной и протеолитической активности. Биомассу мицелия получали методом глубинного культивирования в жидкой глюкозо-пептонной среде. Были подобраны условия культивирования. Для повышенного накопления биомассы применяли дробное добавление глюкозы в процессе ферментации. Из мицелия базидиомицетов были выделены растворимые и нерастворимые углеводные фракции, состоящие преимущественно из полисахаридов с незначительным количеством белка. Основным углеводным компонентом полисахаридных фракций являлась глюкоза с существенным содержанием маннозы и галактозы и следовыми количествами фукозы и ксилозы. Выделенные фракции *L. substrictus* оказывали иммуностимулирующее действие, повышая микробоцидный эффект мононуклеарных фагоцитов в отношении золотистого стафилококка. При этом иммуностимулирующий эффект растворимой фракции был выше аналогичного эффекта нерастворимой фракции. Показано, что водные извлечения мицелия обладали антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: базидиомицеты, биомасса мицелия, культивирование, полисахариды, иммуностимулирующее, антиоксидантное действие

**CONDITIONS FOR CULTIVATION OF STRAINS
OF BASIDIAL FUNGI OF THE GENUS LENTINUS,
CHARACTERISTICS OF COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY**

¹Ananieva E.P., ¹Gurina S.V., ²Psurtseva N.V.

¹St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg,

e-mail: svetlana.gurina@pharminnotech.com, elena.ananieva@pharminnotech.com;

²Botanical Institute named after V.L. Komarov RAS, St. Petersburg, e-mail: nadyapsu@mail.ru

The study is devoted to the peculiarities of basidiomycete fungi cultivation and determination of biological activity of their metabolites. Two strains of *Lentinus substrictus* were selected from six strains of basidiomycete as a result of screening experiments. Selected strains were superior to the other cultures in terms of growth rate, mycelial biomass accumulation, and laccase and proteolytic activities characteristic of many species of basidial fungi. Mycelial biomass was obtained by submerged cultivation in liquid glucose-peptone medium. Cultivation conditions were selected. Fractional addition of glucose during fermentation was used for increased accumulation of mycelial biomass. Soluble and insoluble carbohydrate fractions consisting mainly of polysaccharides with a small amount of protein were isolated from the basidiomycete mycelium. The main carbohydrate component of the polysaccharide fractions was glucose with a significant content of mannose and galactose and trace amounts of fucose and xylose. The isolated fractions of *Lentinus substrictus* had an immunostimulating effect, increasing the microbicidal effect of mononuclear phagocytes against *Staphylococcus aureus*. The immunostimulating effect of the soluble fraction was higher than the similar effect of the insoluble fraction. It was shown that aqueous extracts of mycelium had antioxidant activity.

Keywords: basidiomycetes, mycelium biomass, cultivation, polysaccharides, immunostimulating, antioxidant effect

Введение

Мицелий базидиальных грибов и его метаболиты обладают широким спектром биологической активности, в частности противоопухолевой, антиоксидантной, антимикробной и противовирусной активностями [1-3]. Полисахаридные компоненты, выделенные из плодовых тел или мицелия базидиомицетов, являются перспективными иммуностимуляторами [4; 5]. Суще-

ственным преимуществом базидиальных полисахаридов является физиологичность их действия на организм и отсутствие токсичности. Грибы базидиомицеты выращивают в виде плодовых тел, а также получают вегетативный мицелий при глубинном культивировании. Глубинное культивирование позволяет осуществлять регулируемый синтез нужных метаболитов, сократить время процесса в 3–5 раз и получать стандарт-

ный продукт. Актуальность исследования заключается в поиске новых перспективных базидиомицетов с высокой продуктивностью биологически активных метаболитов.

Цель исследования – изучение процесса глубинного культивирования штаммов базидиомицетов для повышения выхода биомассы мицелия, изучение его компонентного состава и биологической активности.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были штаммы базидиальных грибов, полученные из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова, РАН: *Lentinus substrictus* (Bolton) Zmitr. & Kovalenko LE-BIN 0626; *L. substrictus* LE-BIN 1601; *Ganoderma valesiacum* Boud. LE-BIN 2256; *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray LE-BIN 2639; *Ganoderma tsugae* Murrill LE-BIN 1158; *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer LE-BIN 1483.

Ростовые параметры и морфологические признаки исследуемых базидиомицетов изучали при культивировании на плотных питательных средах, где базидиомицеты образовывали мицелиальные колонии, состоящие из скопления вегетативных гиф.

Для определения скорости роста грибов использовали среды: сусло-агар (4% сусло; 2% агар), мальтекс-агар (1,5% мальтекс; 2% агар) и глюкозо-пептонный агар (ГПА). Состав последней среды аналогичен составу жидкой питательной среды, которая в дальнейших экспериментах будет использована для глубинного культивирования грибов.

Ростовой коэффициент определяли на седьмые сутки культивирования штаммов. Он является комплексным показателем, который учитывает скорость роста в единицу времени и коэффициент плотности мицелия (Кр):

$$Kp = (D / \tau) \cdot H \cdot \Pi,$$

где D – диаметр колонии, мм; H – высота мицелия, мм; Π – коэффициент плотности мицелия (1 – слаборазвитый, 2 – плотный, опушённый, 3 – кожистый, плотный); τ – количество суток.

Ферментативные свойства исследуемых штаммов оценивали по активности некоторых ферментов: протеолитических, лигнинолитического комплекса (ферментов лакказ).

Проверку протеиназной активности проводили на плотных питательных средах с молоком и желатином. Использовали метод аппликации мицелиальных дисков на среды с казеином и желатином. Измеряли зоны гидролиза субстратов.

Наличие компонентов лигнинолитического комплекса (ферментов лакказ) прове-

ряли на среде с реагентом АБТС: основа – сусло-агар 4% с добавлением 0,28% АБТС – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислоты). На плотные питательные среды помещали агаровые блоки с двухнедельной культурой. Учет результатов проводился через 24 часа [6].

Для получения биомассы мицелия проводили глубинное культивирование грибов в жидкой питательной среде. Культуру выращивали в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл (объем питательной среды 150 мл) на лабораторном шейкере ($n = 220$ об./мин.). Культивирование проводили 10 суток при температуре 23-24°C. В качестве базовой питательной среды использовали глюкозо-пептонную среду (ГПС) [7].

Растворимые (НФр) и нерастворимые (НФн) углеводные фракции экстрагировали из измельченного мицелия водой при 100°C в течение 4-5 часов. Моносахаридный состав мицелия и полученных из него фракций определяли после полного кислотного гидролиза. Количественный анализ моносахаридного состава проводили методом ГЖХ с последующим расчётом соотношения площадей полученных пиков [7]. Антиоксидантную активность определяли методом активированной хемолуминесценции [8].

Иммунобиологическое действие выделенных углеводных фракций определяли по изменению микробоцидности макрофагов белых мышей по отношению к клеткам *Staphylococcus aureus* через 24 часа после введения препарата в количестве 100 мг/кг веса животного. Сравнивали выживаемость клеток после 1 минуты контакта со стимулированными полисахаридами макрофагами и макрофагами контрольной группы. Определяли константу киллинга, которая характеризует количество клеток тест-микроорганизма, погибших в единицу времени (минуту) под действием микробоцидных факторов, нарушающих жизнедеятельность микроорганизма [7].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы MS Excel. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением среднего арифметического для каждой группы опытов и стандартного отклонения от среднего арифметического.

Результаты исследования и их обсуждение

Наиболее высокую скорость роста наблюдали у штаммов *Lentinus substrictus* и *Flammulina velutipes*. Максимальный ростовой коэффициент (34,3 мм/сут.) отмечали у штамма *L. substrictus* LE-BIN 1601 при его росте на среде сусло-агар.

Базидиомицеты являются источниками различных ферментов, имеющих практическую ценность [9]. Для оценки ферментативного потенциала исследуемых грибов определяли их лакказную и протеолитическую активности. За 100% принимали максимальное значение показателей у наиболее активного штамма. При сравнении показателей лакказной активности исследуемых штаммов установлено, что максимальная активность (100%) обнаружена у штамма *F. velutipes* LE-BIN 1483. Оба исследованных штамма *Lentinus* обладали достаточно высокой активностью (92%). У штамма *G. frondosa* LE-BIN 2639 лакказная активность не была обнаружена.

Была выявлена высокая протеолитическая активность исследуемых штаммов, которая составляла от 62,3% до 86,7% от наиболее активного штамма. Наиболее активными были штаммы *L. substrictus* LE-BIN 0626, *L. substrictus* LE-BIN 1601 и *F. velutipes* LE-BIN 1483.

На основе проведенных экспериментов, с учетом скорости роста и ферментативной активности грибов, для изучения процессов глубинного культивирования было выбрано 4 штамма: *L. substrictus* LE-BIN 0626 и LE-BIN 1601, *F. velutipes* LE-BIN 1483 и *G. valesiacum* LE-BIN 2256.

Основными преимуществами глубинного культивирования являются регулиру-

емый синтез нужных метаболитов, сокращение времени процесса в 3–5 раз и получение стандартного продукта. Наиболее продуктивными по выходу биомассы мицелия оказались базидиомицеты рода *Lentinus* – выход биомассы мицелия составил 7,0 и 4,8 г/л.

Уже с первых суток культивирования отобранные штаммы начинали активно потреблять источники углерода и азота, при этом наблюдали значительный прирост биомассы мицелия. Наиболее продуктивным являлся штамм *L. substrictus* LE-BIN 0626, в то время как утилизация глюкозы проходила интенсивнее штаммом *L. substrictus* LE-BIN 1601. У обоих штаммов к седьмым суткам в питательной среде глюкозы почти не оставалось (0,09 мг/мл). Базидиомицеты показали высокую скорость накопления биомассы, и к седьмым суткам культивирования наблюдали переход в стационарную фазу роста. Таким образом, в данных условиях возможно сокращение времени культивирования с 10 до 7 суток для этих штаммов грибов, что представлено на рис. 1.

Характер потребления азота существенно не отличался у разных штаммов и имел сходные закономерности. Аминный азот к десятым суткам роста утилизировался на 90% и 80% штаммами *L. substrictus* LE-BIN 0626 и LE-BIN 1601 соответственно.

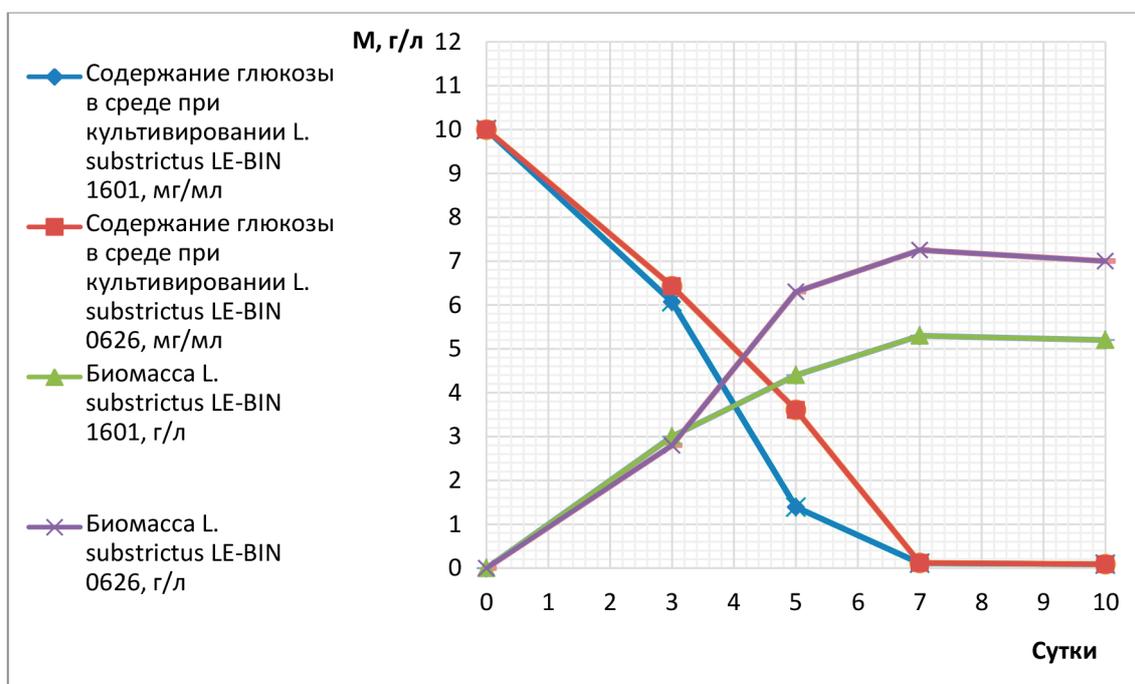


Рис. 1. Динамика утилизации источников углерода и накопление биомассы в процессе культивирования *L. substrictus* LE-BIN 0626 и *L. substrictus* LE-BIN 1601

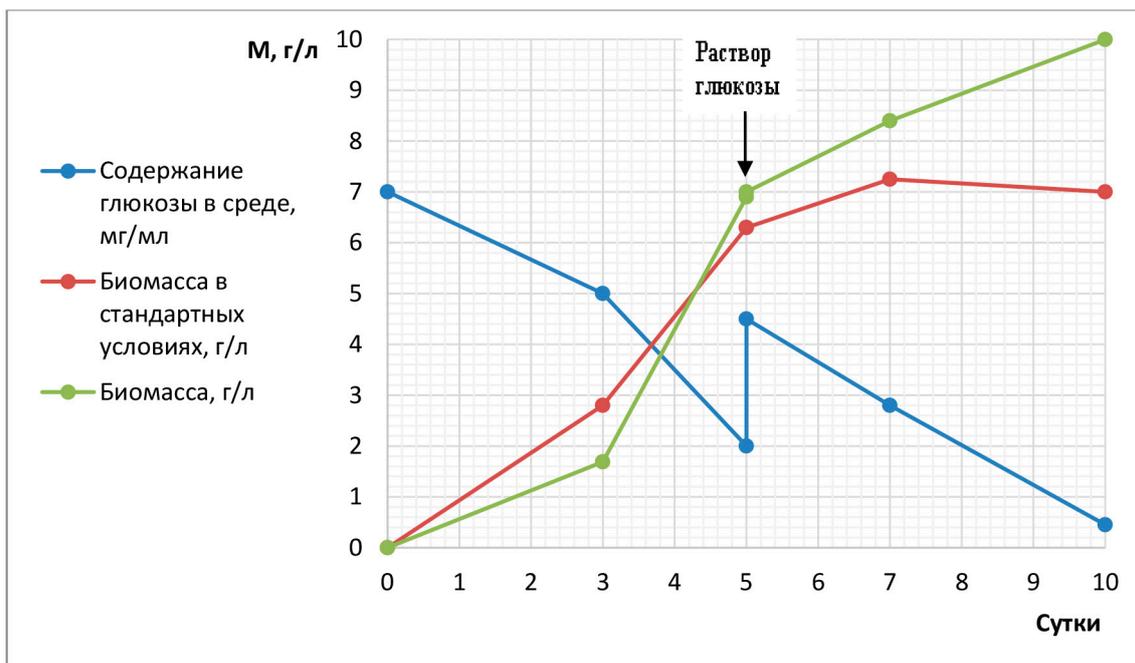


Рис. 2. Динамика утилизации источника углерода и накопления биомассы при культивировании *L. substrictus* LE-BIN 0626 с дробным добавлением глюкозы

Возможно, имеет место лимитирующее действие источника углерода на рост культуры вследствие того, что базидиомицет активно утилизировал глюкозу, и её концентрация уже к седьмым суткам снижалась практически до нуля.

С целью повышения выхода биомассы грибов провели эксперименты с дробной подачей раствора глюкозы. Для этого использовали ГПС, которая содержала 7 г/л глюкозы, и в процессе культивирования на пятые сутки проводили дробную подачу 10% раствора глюкозы таким образом, чтобы общее количество глюкозы в среде соответствовало количеству глюкозы в стандартной ГПС (10 г/л).

Дробное добавление глюкозы приводило к значительному увеличению количества биомассы. Увеличение выхода мицелия составило 51% и 42% у штаммов LE-BIN 0626 и LE-BIN 1601 соответственно, и уже на седьмые сутки был отмечен прирост биомассы на 20% и 50% в сравнении с выходом биомассы в стандартных условиях (рис. 2).

Из полученной биомассы мицелия грибов методом водной экстракции мицелия были выделены нерастворимая (НФр) и растворимая фракции (РФр).

В выделенных фракциях определяли содержание полисахаридов (по количеству редуцирующих веществ в гидролизатах), белка, минеральных примесей. Также определяли количественно углеводный состав

полисахаридов – основного компонента фракций мицелия (таблица).

Показано, что мицелий и полученные из него фракции состояли преимущественно из полисахаридов. Содержание полисахаридов в мицелии составляло от 70% до 73%, белка до 17% и минеральных примесей – 6,4%. Фракции содержали от 61,5% до 85,4% полисахаридов, количество минеральных примесей было незначительным – менее 1%.

Был определен количественный моносахаридный состав выделенных фракций. Фракции, выделенные из мицелия исследованных грибов рода *Lentinus*, содержали глюкозу (60-81%), а также значительное количество маннозы (11,6% и 19% для штаммов LE-BIN 0626 и LE-BIN 1601 соответственно) и галактозы (5-10%), следовые количества ксилозы и фукозы (таблица).

Выделенные фракции мицелия использовали для определения их иммуностимулирующей активности в экспериментах *in vivo*.

Изучение иммунобиологической активности углеводных фракций показало, что константы киллинга после контакта с макрофагами, стимулированными НРф и РФр, составляли соответственно 6,0-6,2 и 6,7-6,9. Таким образом, полученные полисахаридные фракции достоверно увеличивали микробоцидный эффект макрофагов в среднем в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Характеристики химического состава углеводных фракций мицелия
исследованных штаммов *Lentinus substrictus*

Образец	Компонентный состав мицелия, %			Углеводный состав полисахаридов, %				
	Полисахариды	Белок	Минеральные примеси	Глюкоза	Манноза	Галактоза	Ксилоза	Фукоза
РФр LE-BIN 0626	82,7±5,5	1,1±0,1	0,17±0,02	76,3	11,6	8,3	2,3	1,5
НФр LE-BIN 0626	61,5±3,1	4,2±0,8	1,0±0,1	81,4	11,5	5,6	1,1	0,4
РФр LE-BIN 1601	85,4±7,6	1,7±0,4	0,5±0,1	68,1	18,7	10,1	2,5	0,7
НФр LE-BIN 1601	67,6±4,5	8,8±1,2	0,4±0,1	70,7	17,7	8,4	2,3	0,84

Для определения антиоксидантных свойств были получены водные извлечения мицелия штаммов *L. substrictus*. Их добавляли к специальной аналитической системе АБАП/люминол и определяли активность антиоксиданта по интенсивности хемилюминесценции во времени [8]. Показано, что исследуемое водное извлечение мицелия обладало антиоксидантным действием со средним уровнем активности, сопоставимым с известным антиоксидантом – аскорбиновой кислотой.

Заключение

В результате экспериментов из шести культур базидиомицетов были отобраны два штамма из рода *Lentinus*, которые обладали наибольшей скоростью роста, накопления биомассы мицелия и ферментативной активностью. Данные штаммы в процессе глубинного культивирования активно накапливали биомассу с высоким выходом и полной утилизацией источника углерода (глюкозы). При этом время культивирования было сокращено с 10 до 7 суток. При дробном добавлении глюкозы на пятые сутки культивирования значительно повышался выход мицелия, от 42% до 51%. Из мицелия базидиомицетов были выделены фракции, состоящие преимущественно из полисахаридов (61-85%) с незначительным количеством белка (до 8,8%).

Показано, что полисахаридные фракции мицелия *L. substrictus* оказывали иммуностимулирующее действие, которое выражалось в усилении микрооцидного эффекта перитонеальных макрофагов мышей в эксперименте. Обнаружены антиоксидантные свойства водных извлечений мицелия *L. substrictus*.

Список литературы

1. Lowenthal R. The mycelium of the *Trametes versicolor* syn. *Coriolus versicolor* (Turkey tail mushroom) exhibit anti-melanoma activity in vitro // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023. Vol. 161. P. 114424.
2. Adongbede E.M. Antioxidant and antibacterial activity of *Trametes polyzona* (Pers.) Justo // *Food Science and Biotechnology*. 2020. Vol. 29. P. 27-33.
3. Mwangi R.W. The antioxidant potential of different edible and medicinal mushrooms // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022. Vol. 147. P. 112621.
4. Pandya U., Dhuldhaj U., Sahay N. Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview // *Natural Product Research*. 2018. Vol. 33, № 3. P. 1-13.
5. Yang C.L.H., Chik S.C.C., Lau A.S.Y., Chan G.C.F. *Coriolus versicolor* and its bioactive molecule are potential immunomodulators against cancer cell metastasis via inactivation of MAPK pathway // *Journal of Ethnopharmacology*. 2023. Vol. 301. P. 115790.
6. Федорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., Глазунова О.А., Малошенко Л.Г., Куликова Н.А., Королёва О.В. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиальных грибов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2013. Т. 49, № 6. С. 570-576.
6. Glazunova O.A., Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: Oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata* // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13(6). P. e0197667. DOI: /10.1371/journal.pone.0197667.
7. Кожемякина Н.В., Ананьева Е.П., Гурина С.В., Галынкин В.А. Условия культивирования, состав и биологическая активность мицелия *Fl. velutipes* (Fr.) P. Karst. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010. Т. 46, № 5. С. 583-586.
8. Алексеев А.В., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.В. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) // *Вестник Московского университета*. 2012. Т. 53, № 3. С. 187-193.
9. Uber T.M. Enzymes from basidiomycetes – Peculiar and efficient tools for biotechnology // *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press. 2023. P. 129-164.