

**Биологические свойства
лекарственных макромицетов
в культуре**

Т. 2

**Биологические свойства
лекарственных макромицетов
в культуре**

Т. 2

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ им. Н.Г. ХОЛОДНОГО

**Биологические свойства
лекарственных макромицетов
в культуре**

Сборник научных трудов
в двух томах

Том 2

КИЕВ – 2012

УДК 57.082.2:582.282/.284.3:615.322

ББК Е591.4-737+Е591.43/.45я4

Б63

АВТОРЫ: Бисько Н.А., Бабицкая В.Г., Бухало А.С., Круподерова Т.А.,
Ломберг М.Л., Михайлова О.Б., Пучкова Т.А., Соломко Э.Ф.,
Щерба В.В.

РЕЦЕНЗЕНТЫ: д-р биол. наук **Жданова Н.Н.**,

д-р биол. наук **Горовой Л.Ф.**

Б63 Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 2 / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев, 2012. – 459 с.

Книга является сборником экспериментальных оригинальных исследований и обзоров литературы, посвященных проблеме биологии видов лекарственных и съедобных макромицетов. В сборник вошли материалы, подготовленные сотрудниками Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины в соавторстве с учеными других институтов НАН Украины и Беларуси.

Книга предназначена для широкого круга ученых-микологов, студентов и преподавателей вузов медицинского и биологического профиля, грибоводов, людей, интересующихся биологическими свойствами грибов.

*Утверждено к печати ученым советом
Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины*

ISBN 978-966-02-6372-7

© Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
НАН Украины, 2012

СУМЧАТЫЕ ГРИБЫ РОДА *MORCHELLA* DILL.

Михайлова О.Б., Бухало А.С.

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, 01001 Киев, Украина,
e-mail: mikhajlov_e@ukr.net

Представители рода *Morchella* Dill. сморчки относятся к ценным съедобным деликатесным грибам. Они представляют большой научный интерес в связи со специфичностью жизненного цикла, разнообразием морфологии и экологии. В последнее время некоторые виды этого рода, оказались в центре внимания исследователей в связи с установленными у них лекарственными свойствами и возможностью их биотехнологического применения не только для получения мицелиальной массы пищевого назначения, но и биологически активных веществ (Duncan et al., 2002-2004; DaSilva, 2005; Elmastas, 2006; Stanikunaite et al., 2007).

Наиболее важные вопросы биологии и практического использования видов рода *Morchella* представлены в данной главе.

Общая характеристика представителей рода *Morchella* и основные направления их исследования

Согласно современной классификации, род *Morchella* относится к отделу Ascomycota, классу Pezizomycetes, порядку Pezizales, семейству Morchellaceae (Sacc.) Eckbl. По данным последнего издания "Dictionary of Fungi", род *Morchella* содержит 28 видов (Kirk et al., 2008).

Традиционная систематика высших грибов базируется главным образом на определенных анатомо-морфологических признаках плодовых тел и слагающих его элементов. Интерпретации объема рода *Morchella* в современной литературе противоречивы. Этот род является дискуссионным по количеству относящихся к нему видов. Основная причина различных трактовок заключается в том, что для видов этого рода

характерна значительная вариабельность анатомо-морфологического строения плодовых тел под влиянием различных экологических факторов. Именно вследствие свойственного этим грибам полиморфизма по оценке разных авторов (Stott, Mohammed, 2004; Kuo, 2005; Pilz et al., 2007) количество видов в роде *Morchella* может колебаться от 3 до 150 видов.

Сморчки распространены в умеренном поясе Северного полушария, а также в горных районах Индии, Турции, Мексики, Гватемалы (Мир растений, 1991; Barseghyan et al., 2007; Guzman et al., 1985; McLlvaive, Macadam, 1973; Miller, Orson, 1980, Solak et al., 2004). Отдельные виды, например *M. rufobrunnea* Guzmán et Torrez, *M. guatemalensis* Guzmán et Torrez, *M. herediana* Gomez, известны в регионах со средиземноморским и субтропическим типами климата (Guzmán, Taría, 1998). В южном полушарии некоторые представители этого рода встречаются в Австралии, Тасмании, лесах Аргентины и Чили (Faris et al., 1996; Stott, Mohammed, 2004; Arora, 2005).

По данным литературы и микологического гербария Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины (Киев), в микобиоте Украины род *Morchella* представлен 7 видами: *M. conica* Pers., *M. crassipes* (Vent.) Pers., *M. elata* Fr., *M. esculenta* (L.) Pers., *M. semilibera* DC., *M. spongiosa* Boud., *M. steppicola* Zer. Сморчки на территории Украины распространены в основном в Прикарпатье, Полесье и Лесостепи (Зерова, 1974; Смицкая, 1980; Вассер, 1990). В степной зоне Украины встречается *M. steppicola* – сморчок степной, описанный М.Я. Зеровой (1941). Виды *M. steppicola* и *M. crassipes* занесены в Красную книгу Украины (Червона книга України, 2009).

Экологический диапазон плодоношения сморчков в естественных условиях сравнительно широкий (Delmas, 1978; Singer, Harris, 1987; Stamets, 2000; Pilz et al., 2007). На территории Украины сморчки плодоносят короткий период весной (апрель–май), в лиственных, смешанных и хвойных лесах, в степях, особенно целинных (Зерова 1974; Смицкая, 1980; Дудка, Вассер, 1987; Вассер, 1990). Хотя некоторые авторы (Delmas, 1978) считают их в основном компонентами рудеральных ценозов, а не лесных массивов. Очень часто сморчки можно найти в старых яблоневых садах, на песчаных почвах вдоль лесных ручьев и рек, по склонам оврагов, в зарослях ивняка, у подножья старых тополей, дубов, вязов, вдоль лесных дорог.

Другой экологической особенностью сморчков является их массовое плодоношение в разрушенных экотопах. Эти грибы хорошо адаптированы к условиям нестабильных или временных местообитаний, в которых конкуренция со стороны других микроорганизмов незначительна. Виды *M. conica*, *M. elata*, *M. esculenta*, *M. angusticeps* явно приурочены к местам, подвергшимся воздействию огня (пирогенные местообитания) (Delmas, 1978; Apfelbaum et al., 1984). По мнению некоторых исследователей (Мир растений, 1991; Белякова и др., 2006; Delmas, 1978), сморчки не являются облигатными карбофилами, способны развиваться на почвах с нормальной микобиотой, хотя частичная стерилизация грунта, исчезновение конкурентной микрофлоры и обогащение грунта зольными элементами стимулируют их развитие.

Некоторые виды сморчков в природе способны создавать ассоциации с высшими растениями (Sutton, Sheppard, 1976; Buscot, Roux, 1987; Buscot, 1992a, b; Buscot, 1994; Dahlstrom et al., 2000). Вегетативные гифы гриба формируют эктомикоризу вокруг корней сосудистых растений в виде мицелиальных чехлов. В литературе описаны ассоциации *Morchella* spp. с *Fraxinus excelsior* L., *Ligustrum vulgare* L., *Ulmus campestris* L. Mill., Wilkomm, *Quercus robusta* C.H. Mull., *Corylus avellana* L., *Cornus sanguinea* L. и травянистыми растениями *Equisetum hiemale* L., *Illium irsinum* L. Виды *M. esculenta*, *M. elata* и *M. rotunda* образуют эктомикоризу с корнями *Picea abies* (L.) Karst., вид *M. conica* с *Pinus sylvestris* L. (Buscot, Roux, 1987; Buscot, Kottke, 1990; Buscot, 1992a, b, 1994). Природа этих ассоциаций окончательно не установлена и недостаточно исследована. По мнению Ф. Баскота и Дж. Коттке (1990), такие ассоциации, возможно, являются одним из механизмов выживания сморчков в лесных экосистемах.

В жизненном цикле сморчков установлено наличие стадии формирования склероциев, которые играют очень важную роль при выживании этих грибов в неблагоприятных экологических условиях. Склероции – образования неправильной формы, размер, консистенция и цвет которых зависят от вида гриба. Они содержат запасной питательный материал, как правило, в форме липидов, необходимый для роста и развития плодового тела. Проведенные Ф. Баскотом с соавт. (Buscot, Kottke, 1990) эколого-физиологические исследования установили, что эти

структуры формируются на протяжении лета и осени, остаются в покое зимой, а весной способны дать начало плодovому телу или прорастают вегетативным мицелием, который способен создать новые ассоциации с высшими растениями.

Морфология, анатомия, цикл развития и размножение

Сморчки являются представителями класса сумчатых грибов (аскомицетов). Половое размножение происходит спорами, заключенными в так называемые сумки (аски). У сморчков сумки развиваются в плодовых телах – апотециях, развитию которых предшествует половой процесс. Аскогонов и антеридиев нет, происходит соматогамия (как у базидиомицетов) – слияние клеток обычных вегетативных гиф, имеющих разные аллели локуса спаривания (гетероталлизм). Плодовые тела крупные 2–25 см высотой, мясистые, расчленены на шляпку и ножку. Шляпка шаровидно-колокольчатая, яйцевидная, эллипсоидальная или коническая, с сетью продольных и поперечных косых ребер, ячеистая, снизу сросшаяся с ножкой. Ножка цилиндрическая, сверху или книзу слегка расширяющаяся или очень толстая, иногда бороздчатая или продольно-складчатая, голая, гладкая или чешуйчатая. Все плодовое тело полое. Цвет шляпки варьирует от грязно-серовато-белого до темно-коричневого, в зависимости от вида и возраста плодового тела. Гимений располагается только по поверхности углублений – дну и склонам ребер, а края ребер остаются стерильными. Он состоит из сумок с 8 аскоспорами. Сумки крупные цилиндрические, на верхушке закругленные. Аскоспоры шаровидные или эллипсоидальные, гладкие или с неровной поверхностью (под электронным микроскопом), расположены в один ряд, в зрелости многоядерные. Парафизы нитевидные, на верхушке расширенные. Выбрасывание аскоспор у них происходит постепенно и регулируется интенсивностью солнечной радиации (Смицкая, 1980; Вассер, 1990; Мир растений, 1991; Ботаника, 2007).

На основе своих цитологических исследований Т. Волк и Т. Леонард (Volk, Leonard, 1990) предложили схему жизненного цикла для видов рода *Morchella*. Однако, по нашему мнению,

жизненный цикл этой группы грибов наиболее полно и детально представлен на рис. 1 Д Пилзом с соавт. (Pilz et al., 2007). Согласно этой схеме, цикл развития начинается с прорастания аскоспоры, содержащей от 20 до 60 гаплоидных ядер, и дает начало многоядерному первичному (гаплоидному) мицелию, который характеризуется непродолжительным существованием. Затем гифы первичного мицелия образуют анастомозы или легко сливаются с гифами мицелия из другой проросшей аскоспоры. В результате слияний возникает гетерокариотический мицелий, который в дальнейшем способен формировать ассоциации с высшими растениями, конидиальные спороношения или склероции. Последние при определенных экологических условиях дают начало плодовым телам либо вегетативному мицелию.

По мнению многих авторов (Jacobs, 1982; Gessner et al., 1987; Gessner, 1995; Wipf et al., 1999, 2001), гетерокариотическая природа вегетативного мицелия создает потенциал для расширения адаптивных возможностей гриба по отношению к широкому диапазону экологических факторов и обуславливает значительную вариабельность анатомо-морфологического строения плодовых тел видов рода *Morchella*.

В жизненном цикле грибов преобладает вегетативная стадия развития, играющая важную роль в их онтогенезе. Большинство известных видов рода *Morchella* в культуре исследованы поверхностно или не исследованы вообще, а опубликованные данные о развитии этих грибов в культуре касаются незначительного количества видов.

Биология видов рода *Morchella* в чистой культуре

Получение чистых мицелиальных культур видов рода *Morchella* осуществляют методами, которые применяются для получения чистых культур других макромицетов, а именно: тканевым методом из плодовых тел или проращиванием аскоспор (Сміцька та ін., 1978; Volk, Leonard, 1989; Amir et al., 1992, 1993; Buscot, 1993; Stamets, 2000). Хотя многие исследователи предпочитают второй метод. Процент прорастания аскоспор, даже после длительного хранения (4-5 лет), очень высокий (Buscot, 1993). Аскоспоры прорастают приблизительно за 24–48 ч (Hervey et al., 1978; Buscot, 1993; Stamets, 2000).

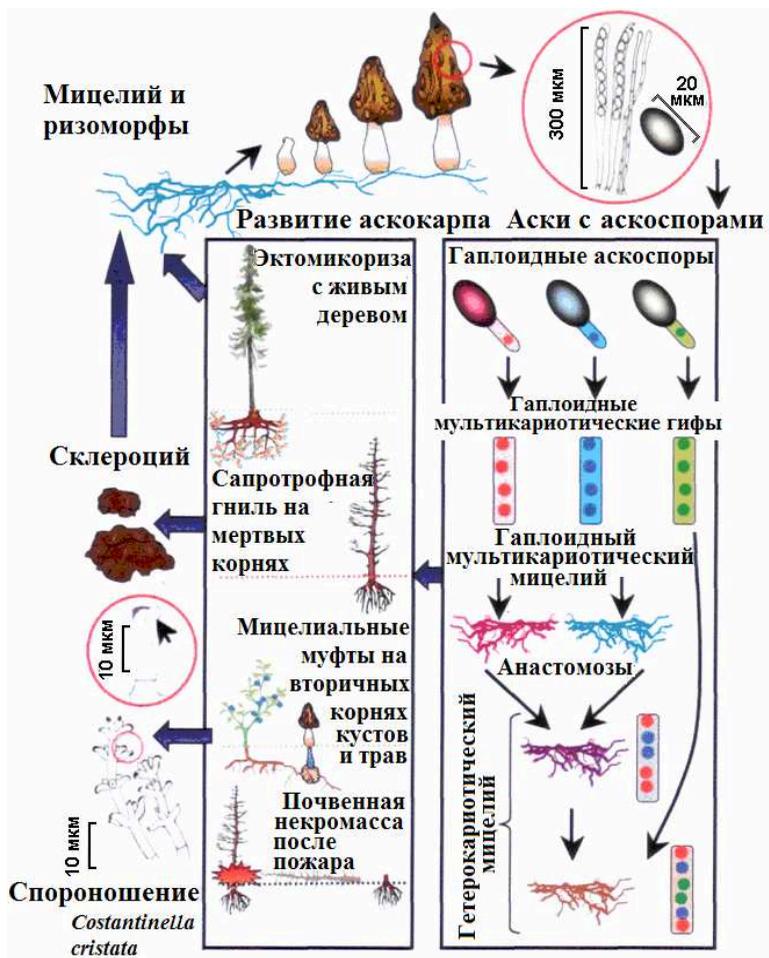


Рис. 1. Схема жизненного цикла видов рода *Morchella* (Pilz et al., 2007)

Вегетативный мицелий состоит из окрашенных сильно разветвленных гиф диаметром 5–10 мкм. Они равномерно септированы, в центре септ находится пора, сквозь которую осуществляется миграция клеточных органелл, а также транспорт питательных веществ.

При изучении культурально-морфологических особенностей некоторых *Morchella* spp. главное внимание было направлено на установление основных характеристик мицелиальных колоний (Куткова, Сухомлин, 2007; Hervey et al., 1978; Volk, Leonard, 1989; Buscot, 1993; Stamets, 2000; Masaphy, 2004). А. Харви с соавт. (Hervey et al., 1978) на основе морфологических признаков выделили два основных типа мицелиальных колоний у *M. esculenta*.

Изучая морфологию роста *M. Esculenta*, Р. Майер (цит. по: Buscot, 1993) описал основные типы склероциев, формирующихся в чистой культуре на питательных агаризованных средах.

Р. Амиром с соавт. (Amir et al., 1992-1995) изучены питательные потребности культур *M. esculenta* и установлены основные экологические факторы, влияющие на формирование склероциев. Необходимым условием для образования последних, по мнению авторов, является дефицит питательных веществ в субстрате. Кроме того, были описаны и охарактеризованы шесть стадий гифального роста и формирования склероциев. Благодаря разработанной методике с применением радиоактивного углерода ^{14}C было установлено, что вначале в склероциях накапливаются питательные вещества в форме липидов, а при нарушении состояния покоя они переходят в молодой вегетативный мицелий. Однако условия, при которых склероции дают начало плодовым телам, остаются невыясненными.

С. Масафи (Masaphy, 2004) приводит данные о росте вегетативного мицелия *M. esculenta* на агаризованных питательных средах с добавлением минеральных солей: CaCO_3 , MgCO_3 , CaO , Na_2CO_3 , K_2CO_3 . Установлено, что добавление CaCO_3 значительно увеличивает скорость роста вегетативного мицелия и стимулирует формирование склероциев по сравнению с другими неорганическими солями. Изучая питательные потребности *M. elata* на агаризованных и жидких питательных средах, Р. Виндер (Winder, 2006) установил влияние источников

углеродного питания на рост и морфологию мицелиальных колоний.

Добавление в субстраты органических источников азота, таких как пептон, аспарагиновая кислота, стимулировало формирование большого количества склероциев у *M. esculenta*. При этом источники углерода – крахмал и простые сахара – существенно не влияли на количество и размер образующихся склероциев (Volk, Leonard, 1989).

Данные литературы о росте и морфологии вегетативного мицелия представителей рода *Morchella* в условиях глубинной культуры неполные. В 60-х гг. XX ст. начались поиски новых видов и штаммов съедобных макромицетов, способных расти в глубинной культуре. Виды *M. hortensis*, *M. esculenta* и *M. crassipes* одними из первых стали выращивать в промышленных масштабах для получения глубинным способом мицелиальной массы пищевого назначения. Использовали синтетические и комплексные питательные среды, содержащие отходы пищевой и бумажной промышленности, в первую очередь молочную сыворотку, кукурузный и тыквенный экстракт, сульфатные щелока (Sugihara, Humfeld, 1954; Hamid et al., 1972).

Дж. Лишфельд с соавт. (Litchfield et al., 1963; Litchfield, 1967) исследовали рост и морфологию *M. esculenta* и *M. crassipes* в глубинной культуре на оптимизированной жидкой среде с глюкозой и кукурузным экстрактом. Максимальный выход мицелиальной массы у селектированных штаммов составлял 20 г/л на 3-и сутки культивирования.

Дж. Робинс и А. Герви (Robbins, Hervey, 1965), изучая *M. crassipes* в культуре, установили, что добавление к синтетической среде минеральных солей, в частности марганца, экстракта из сухой древесины бука способствует накоплению мицелиальной массы.

Практическое значение представителей рода *Morchella*

Все виды рода *Morchella* относятся к деликатесным съедобным грибам и высоко ценятся за специфический нежный аромат и отменный вкус. Кроме того они содержат уникальный комплекс физиологически активных веществ: белки (до 25%), незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, лейцин, изолей-

цин, треонин, валин), все витамины группы В, липиды, углеводы (моно-, ди-, олиго- и полисахариды), макро- и микроэлементы (К, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn и др.) (Chang, Hayes, 1978; Ying et al., 1987). Сморчки являются традиционным продуктом питания во многих странах мира, однако до сих пор еще не разработана технология получения плодовых тел в промышленных условиях. В 1986 г. Р. Овером с соавт. (Ower et al., 1986) был предложен способ культивирования для *Morchella* spp., и в течение последующих нескольких лет опубликовано еще два патента (Ower et al., 1988, 1989). Однако, несмотря на детальное описание, технологию Р. Овера не удалось воспроизвести последующим исследователям. В ряде публикаций (Kuo, 1992; Pilz et al., 2007) высказывается мнение, что неудачные попытки повторить эту технологию можно объяснить тем, что этот метод был разработан для американского вида *M. rufobrunnea*, произрастающего только в субтропической зоне Американского континента.

Поэтому сегодня основным способом получения плодовых тел сморчков остается их сбор в природных условиях. В США стоимость этих грибов в зависимости от сезона колеблется от 40 до 70 долларов за 1 кг (Leonard, Volk, 1992; Rowe, 1997), в Австралии свежие сморчки стоят от 60 до 120 австралийских долларов (Stott, Mohammed, 2004).

В странах Азии, особенно в Китае и Индии, виды рода *Morchella* издавна использовали в традиционной восточной медицине в форме отваров, чаев и настоев.

Из литературы известно, что употребление водных экстрактов из плодовых тел *M. esculenta*, *M. conica*, *M. deliciosa* Fr. повышает иммунитет, тонизирует функционирование желудочно-кишечного тракта, снижает воспалительные процессы, регулирует «поток жизненной энергии» (Денисова, 1998; Yang, Jong, 1989; Hobbs, 1996; Li et al., 2004; Yang et al., 2005; Li, 2006; Dai et al., 2009). На Руси отвары из плодовых тел *M. conica* (сморчка конического) использовали при лечении близорукости, возрастной дальнозоркости и катаракте (Денисова, 1998).

Лекарственные свойства наиболее известных видов, таких как *Morchella conica* и *M. esculenta*, подтверждены современными научными исследованиями (Duncan et al., 2002, 2003; Prasad et al., 2002; Mau et al., 2004; Elmastas et al., 2006; Turkoglu et al., 2006; Nitha et al., 2007). Соединения, входящие в состав этих грибов,

улучшают состояние иммунной системы, усиливают резистентность к различным патогенным организмам, повышают адаптационные возможности организма, гармонизируют обменные процессы. Биологическое действие сморчков определяют в первую очередь иммуностимулирующие полисахариды, активирующие иммунные клетки организма, однако механизм их действия полностью не изучен.

В последние годы активно ведутся работы по изучению биохимической характеристики различных полисахаридных фракций. Из плодовых тел *M. esculenta* получено две полисахаридные фракции, определены их молекулярная масса, структурные формулы, типы связей и степень разветвления. Установлено, что высокомолекулярный полисахарид – галактозманнан, который входит в состав плодовых тел *M. esculenta*, обладает высокой биологической активностью (Duncan et al., 2002, 2003). При проведении клинических испытаний установлено, что этанольные экстракты из плодовых тел *M. esculenta* проявляют высокую фагоцитарную активность (Duncan et al., 2003). Из культурального мицелия *M. esculenta* получены этанольные фракции с противоопухолевой и противовоспалительной активностями (Nitha et al., 2007). Установлена адаптогенная и иммуностимулирующая активность метаболитов *M. esculenta* (Prasad et al., 2002).

Спиртовые экстракты из плодовых тел *M. esculenta* и *M. vulgaris*, а также метанольный экстракт глубинного мицелия *M. esculenta* проявили антиоксидантную активность (Mau et al., 2004; Elmastas et al., 2006). Была установлена высокая степень ингибирования перекисного окисления линоленовой кислоты (80–87%) по сравнению с антиоксидантом α -токоферолом (50–77%).

Практическое использование некоторых видов рода *Morchella* тесно связано с получением грибного мицелия пищевого назначения на основе их глубинного культивирования. Культуральный мицелий сморчков благодаря высокому содержанию в нем белка и стойкому грибному аромату используют в качестве вкусовых приправ для соусов и супов. Методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии были изолированы вещества, обуславливающие грибной аромат плодовых тел и культурального мицелия этих грибов, а также установлена их химическая структура (Rotzoll et al., 2005).

Запатентованный в 1991 г. метод получения нового природного пигмента темно-синего цвета был идентифицирован как индиго (Eyal et al., 1991). Продуцентом пигмента была культура гриба *M. rotunda*. Доказана возможность его использования в качестве красителя в легкой, пищевой и фармацевтической промышленности. Разработаны основы биосинтеза пигмента культурой гриба: подобраны жидкие питательные среды, условия ведения процесса – время культивирования, температура, pH среды, которые обеспечивали максимальное накопление пигмента.

По мнению многих исследователей (Humfeld, Sugihara, 1949; Humfeld, 1951; Litchfield, 1967; Janardhanan et al., 1970; Eyal et al., 1991; Rotzoll et al., 2005), виды рода *Morchella* можно отнести к перспективным продуцентам не только пищевой биомассы, а также различных биологически активных и ценных химических веществ, которые могут быть как конечным продуктом при культивировании мицелия этих грибов, так и побочным при промышленном производстве биомассы.

Таким образом, данные литературы о пищевой и лекарственной ценности некоторых видов рода *Morchella* позволяют считать, что эта группа грибов может служить дополнительным источником белка, некоторых витаминов и незаменимых аминокислот, а также уникальных биологически активных веществ, позитивно влияющих на здоровье человека. Очевидно, что уникальный комплекс физиологически активных веществ разнообразного спектра лечебного действия, выявленный в плодовых телах и глубинном мицелии видов рода *Morchella*, может быть перспективным для использования в комплексной терапии при лечении некоторых заболеваний. Однако следует заметить, что механизм действия биологически активных веществ сморчков до конца еще не установлен.

Состояние изученности видов рода *Morchella* в чистой культуре определило основные направления нашего исследования. Особое внимание уделялось изучению, с нашей точки зрения, важных признаков: росту и морфологии культур, их физиологическим свойствам (отношение к температуре, pH среды, источникам углерода и азота, наличию определенных ферментов), подбору питательных сред для выращивания штаммов-продуцентов мицелиальной массы в различных условиях культивирования.

Материалы и методы

Микробиологические методы, которые мы использовали в данном исследовании, являются общепринятыми при работе с чистыми культурами непатогенных микроорганизмов, в том числе мицелиальных грибов (Методы ..., 1982; Бухало, 1988).

2.1. Объекты исследования

Объектом исследования были чистые культуры 30 штаммов 8 видов рода *Morchella* разного географического происхождения (табл. 1), которые сохраняются в Коллекции культур шляпочных грибов Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины (ИБК) (Каталог культур, 2006).

2.2. Получение чистых культур видов рода *Morchella*

Выделение мицелиальных культур видов рода *Morchella* проводили методом проращивания аскоспор по известной методике (Buscot, 1993). Плодовые тела сморчков собирали в период их плодоношения, отбирая неповрежденные наиболее зрелые грибы. Каждое плодовое тело помещали отдельно в бумажный или полиэтиленовый пакет и хранили в холодильнике при температуре 4–10 °С. Для сбора спорового материала использовали чашки Петри. С поверхности плодового тела, предназначенного для выделения культуры, удаляли прилипшие растительные остатки, частички грунта, быстро промывали проточной, а затем стерильной водой и сушили на фильтровальной бумаге. Затем шляпку гриба на несколько часов помещали стерильную чашку Петри и после получения спорового порошка в стерильно удаляли. Наиболее быстрому высвобождению спор соответствовала температура 25–26 °С и солнечный свет. В закрытых чашках Петри споровые отпечатки могут храниться в течение нескольких лет при температуре 20–22 °С.

Для проращивания аскоспор однородную споровую суспензию, приготовленную методом последовательных разбавлений, высевали на агаризованную питательную среду в чашки Петри. Для выделения культур обычно использовали сусло-агар (СА) и картофельно-глюкозный агар (КГА).

Таблица 1. Список исследованных штаммов и видов рода
Morchella

№ п/п	Вид	Номер штамма в коллекции ИБК	Год выделения культуры из природного материала, страна происхождения
1	<i>Morchella angusticeps</i> Peck	1833	2002, Индия •
2	<i>M. conica</i> Pers.	1737	1991, Германия *
3		1738	1993, Израиль *
4		1739	1993, Израиль *
5		1835	2004, Германия •
6		1852	2005, Украина
7	<i>M. crassipes</i> (Vent.) Pers.	1834	2004, Германия •
8		1851	2005, Германия •
9		1852	2005, Германия •
10	<i>M. elata</i> Fr.	1891	2006, Украина
11	<i>M. esculenta</i> (L.) Pers.	1744	1987, Франция *
12		1746	1987, Франция *
13		1747	1987, Франция *
14		1748	1987, Франция *
15		1749	2000, США *
16		1750	1990, Франция *
17		1753	1987, Франция *
18		1755	1990, Франция *
19		1805	2003, США **
20		1820	2003, США **
21		1843	2005, Украина
22		1844	2004, Украина
23	<i>M. semilibera</i> DC.	1740	2000, Германия *
24		1846	2005, Украина
25		1984	2006, Украина
26		1985	2006, Украина
27	<i>M. spongiosa</i> Boud.	1837	2006, Украина
28		1838	2004, Франция •
29		1850	2004, Франция •
30	<i>M. steppicola</i> Zer.	1849	2005, Украина ***

* – Культуры из коллекции проф. Ф. Баскота (Ун-т им. Ф. Шиллера, г. Йена, Германия); ** – из коллекции П. Стаметса (США); *** – из коллекции Донецкого госуниверситета, полученные от д.б.н., проф. М.Н. Сухомлин (Украина); • – культуры, изолированные автором из спорового материала, полученного от Х. Кельнера (Ун-т г. Лейпциг, Германия).

Для подавления роста бактерий добавляли антибиотики – 200 Ед. пенициллина и 100 Ед. стрептомицина на 1 мл питательной среды (Бухало, 1988). Чашки Петри со спорами инкубировали в термостате при 26 °С до формирования многоспоровой культуры. Далее проводили 2-3 пассажа на СА с антибиотиком, затем культуру переносили в пробирки на СА для сохранения в коллекции и дальнейших исследований. Отсутствие посторонней микрофлоры, особенности морфологии мицелиальных колоний и вегетативного мицелия контролировали как визуально, так и под световым микроскопом.

Культуры хранили в холодильнике в пробирках с 20 см³ питательной среды и периодически пересеивали на агаризованное пивное сусло (рН 6-6,5; сахаристость 8° по Баллингу) один раз в 10-11 месяцев.

Методы лабораторных исследований

Культивирование на агаризованных питательных средах и субстратах

Исследование морфологии и роста чистых культур представителей рода *Morchella* проводили на агаризованных питательных средах разного состава. Культуры, кроме специальных опытов, инкубировали при температуре 26±1 °С. Использовали питательные среды следующего состава:

- 1) агаризованное пивное сусло (СА): пивное сусло, сахаристость 8° по Баллингу – 1 л, агар-агар – 20 г (Бухало, 1988);
- 2) мальц-экстракт агар (МЕА, "DIFCO");
- 3) картофельно-декстрозный агар (КДА, "DIFCO");
- 4) агар Чапека (ЧА) (Методы ..., 1982);
- 5) компостный агар (КА), г/л: сухой измельченный компост – 76, агар-агар – 20;
- 6) овсяно-мальц-дрожжевой агар (ВМДА) (Stamets, 2000);
- 7) глюкозо-пептон-дрожжевой агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 5,0; пептон – 2,5; дрожжевой экстракт – 0,5; агар-агар – 20 (Molitoris, 2000).

Кислотность питательных сред доводили до значения рН 6,5 при помощи растворов 1н. КОН и 1 н. НСl.

Культурально-морфологические исследования проводили по общепринятым методикам (Бухало, 1988). Скорость радиального роста рассчитывали по методике, описанной ранее (Соломко и др., 2000).

Культивирование на жидких питательных средах

Исследование роста и динамики изменений основных ростовых показателей осуществляли на жидких средах следующего состава, г/л:

- 1) среда ПС: пивное неохмеленное сусло (4° по Баллингу);
- 2) среда ГПД, г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дрожжевой экстракт – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, вода дистиллированная, 1 л;
- 3) комплексная среда С, г/л: глюкоза – 24,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2,0; кукурузный экстракт – 10,0 мл, вода дистиллированная до 1 л (Litchfield, 1967);
- 4) синтетическая среда Д, г/л: глюкоза – 25,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,02; FeSO_4 – 0,02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, вода дистиллированная, 1 л (Litchfield, 1967);
- 5) среда Норкранс (НРК), г/л: глюкоза – 10,0; аммоний виннокислый – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; железо лимоннокислое – 0,005; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0044; CaCl_2 – 0,0555; витамин В₁ – 0,04, вода дистиллированная до 1 л (Бухало, 1988).

Кислотность сред доводили до значения pH 6,5 при помощи растворов 1 н. КОН и HCl.

Глубинное культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, на качалке при 150–180 об/мин и температуре инкубации 26 ± 1 °С. Соотношение жидкой и воздушной фаз во встряхиваемых сосудах составляло 1:10. Инокулировали физиологично активным мицелием по методике, разработанной для мицелиальных грибов (Соломко, Митропольская, 1994) в количестве 10% объема. Перед инокуляцией проводили микробиологический контроль чистоты питательной среды и посевного материала. Исследование проводили на протяжении 14 сут в 5-кратной повторности. Динамику изменения основных ростовых показателей фиксировали каждые сутки.

Исследование влияния физико-химических факторов (температуры инкубации, кислотности среды, источников питания) на рост и морфологию культур

При исследовании роста и морфологии культур при разных температурах в качестве питательной среды использовали агаризованное пивное сусло. Инокулированные мицелиальной культурой чашки Петри помещали в термостат при температуре 18 ± 1 ; 26 ± 1 и 34 ± 1 °C, а также в холодильник при 4 ± 1 °C. Рост культур оценивали так же, как при изучении культурально-морфологических особенностей на питательных средах разного состава.

Для определения влияния кислотности среды на рост мицелия использовали синтетическую среду А следующего состава, г/л: глюкоза – 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,003; ZnCl_2 – 0,005.

Значения pH среды изменяли в интервале 2–8 с шагом 1. Для создания необходимого pH среды, который измеряли до и после стерилизации, добавляли раствор 1 н. КОН и 1 н. HCl.

Исследование питательных потребностей культур на жидких питательных средах

Изучали влияние различных источников углерода и азота на рост культур грибов. опыты проводили в 5-кратной повторности. Для определения отношения культур к источнику углерода использовали синтетическую среду А, состав которой приведен выше. Источниками углерода служили моносахариды (глюкоза, ксилоза), ди-(сахароза, лактоза) и трисахариды (рафиноза), полисахариды (крахмал), которые добавляли в среду в количествах, эквивалентных 20 г глюкозы по углероду, pH 6,5.

Источниками азота служили нитраты натрия и аммония, аспарагин и пептон, которые вносили в питательные среды в количестве, эквивалентном 4 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ по азоту. Исследования проводили поверхностно в 250 мл колбах Эрленмейера, в которые наливали по 50 мл питательной среды. В качестве инокуляма использовали 5–7-суточные культуры грибов, предварительно выращенные на СА при температуре 26 ± 1 °C. В

каждую колбу с жидкой средой вносили по три мицелиальных диска ($d = 5$ мм). Культуры инкубировали в стационарных условиях при 26 ± 1 °С. Массу мицелия определяли, когда в одном из вариантов мицелиальная пленка полностью покрывала всю поверхность среды. По окончании опыта измеряли значение рН среды и сухую массу мицелия.

Анализ биомассы и культуральных жидкостей

При изучении динамики роста учитывали биомассу, анализируя ее каждые сутки культивирования (до 10 сут). Проводили химический анализ мицелия, высушенного при 60 °С. Полученные результаты пересчитывали на абсолютно сухую массу. 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 граммах сухого вещества на 1 л среды. Сухие вещества в культуральной жидкости определяли весовым методом. Культуральный фильтрат объемом 5 мл испаряли, затем высушивали в сушильном шкафу при 105 °С до абсолютно сухой массы в предварительно взвешенном бюксе. Концентрацию сухих веществ рассчитывали в г/л.

Редуцирующие вещества (РВ) в культуральной жидкости определяли методом Хагедорна–Йенсена следующим образом: в пробирку вносили 1 мл культуральной жидкости и добавляли 3 мл феррицианидного реактива. Смесь кипятили на водяной бане в течение 10 мин, охлаждали и измеряли интенсивность окрашивания на спектрофотометре (ФЕК) при длине волны 400 нм относительно дистиллированной воды. Содержание РВ определяли по калибровочному графику, который был предварительно построен с использованием глюкозы в качестве стандарта. Расчет проводили по формуле: $PP = xp$, где x – количество глюкозы по калибровочной кривой, мкг/мл; p – коэффициент, учитывающий разбавление пробы.

Для определения количества экзополисахаридов 5 мл культуральной жидкости осаждали 10 мл 96%-го этанола. Раствор отстаивали в течение 24 ч в холодильнике при температуре 4 ± 1 °С. На следующие сутки осадок отделяли центрифугированием в течение 25 мин в режиме 6000–7000 об/мин.

Надосадочную жидкость сливали, а осадок растворяли в 5 мл горячей дистиллированной воды. Из полученного раствора отбирали 2 мл жидкости, в которой определяли количество экзополисахаридов (П) фенол-сернистым методом (Захарова, Косенко, 1982). В пробирку с 2 мл раствора вводили дистиллированную воду до объема 50 мл. Отбирали 2 мл растворенного образца, и к нему последовательно при постоянном перемешивании добавляли 0,05 мл 80%-го фенола, 5 мл очищенной концентрированной H_2SO_4 . После чего на спектрофотометре определяли оптическую плотность при $\lambda = 490$ нм. Содержание экзополисахаридов рассчитывали по калибровочному графику с использованием галактозы в качестве стандарта. Рассчитывали по формуле: $P = xp$, где x – количество галактозы по калибровочной кривой, мкг/мл; p – коэффициент, учитывающий разбавление пробы.

Экономический коэффициент (Y) рассчитывали по источнику углерода на основании данных определения абсолютно сухой массы мицелия и редуцирующих веществ в культуральной жидкости по формуле (Перт, 1978):

$$Y = \frac{X}{S_0 - S_n},$$

где X – урожай биомассы г/л; S_0 и S_n – начальное и конечное содержание РВ в культуральной жидкости, г/л.

Содержание общего азота в образцах биомассы устанавливали по методу Кьельдаля. При расчете сырого протеина использовали общепринятый коэффициент 4,38 (Crisan, Sands, 1978). Содержание сырого жира определяли весовым методом после эфирной экстракции мицелия в аппарате Сокслета в течение 12 ч (Методы ..., 1982).

Исследование наличия ферментативной активности с помощью качественных цветовых химических реакций

Для определения наличия ферментативной активности использовали известные методы и реактивы (Molitoris, 1987). При проведении качественных реакций исследуемые штаммы выращивали на глюкозо-пептон-дрожжевой агаризованной

среде (ГПДА) или пептон-дрожжевой агаризованной среде (ПДА) следующего состава: ГПДА глюкоза – 5 г/л, пептон – 2,5 г/л, дрожжевой экстракт – 0,5 г/л, агар-агар 20 г/л. Кислотность среды доводили до нужного уровня перед стерилизацией с помощью растворов 1 н. КОН или 1 н. HCl. Проводили прямые и непрямые качественные тесты.

Прямые тесты (п.) – реактивы, необходимые для выявления ферментативной активности, вносили непосредственно в субстрат перед инокуляцией культурой гриба. Наличие ферментативной активности выявлялось при разложении веществ субстрата, что проявлялось в помутнении, просветлении или изменении его окраски.

Непрямые тесты (н.) – реактивы, нужные для выявления ферментативной активности, наносили на поверхность выросшей мицелиальной колонии. Наличие ферментативной активности регистрировалось при помутнении, прояснении или изменении окраски субстрата.

Для проведения тестов использовали чашки Петри (ч. П.) и пробирки (пр.) в 5-кратной повторности.

Исследовали 12 ферментов, которые характеризуют: окислительно-восстановительные процессы – оксидазы (лакказы, тирозиназа, пероксидаза), метаболизм азотных соединений (уреаза, нитрат-редуктаза), углеводов (амилаза, целлюлоза, ксиланаза, β-глюкозидаза, полигалактуроназа, пектаттранс-элиминаза), липидов (липаза).

Ферменты окислительно-восстановительных процессов

Наличие у исследованных штаммов грибов оксидаз на поверхности мицелиальной колонии устанавливали с помощью качественных цветовых химических реакций, которые проводили путем нанесения капли реактива на поверхность растущей на агаризованной среде мицелиальной колонии (Tura et al., 2009).

Ферменты обмена углеродных соединений

Амилаза. Н., ч.П., регистрация наличия активности через 5–30 мин. Среда: 900 мл ГПДА смешивали с 100 мл раствора крахмала (2 г крахмала в 100 мл), рН 6,0. Принцип: крахмал расщепляется амилазой и при нанесении 3%-го раствора Люголя нерасщепленный крахмал окрашивается в фиолетовый

цвет, а в зоне активности фермента среда остается бесцветной.

Целлюлаза. Н., ч.П., регистрация наличия активности через 30 мин и 24 ч. Среда: к ПДА добавляли 5 г растворимой карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), рН 7,0. Принцип: КМЦ расщепляется целлюлазой и при обработке среды 0,001%-м раствором конго-красного в течение 30 мин, среда с нерасщепленной КМЦ окрашивается в красный цвет, зона активности фермента остается прозрачной.

Полигалактуроназа. Н., ч.П., регистрация наличия активности через 60 мин и 24 ч. Среда: к ГПДА добавляли 5 г пектина, 2,24 г tris и 2,32 г малеиновой кислоты, рН 5,0. Принцип: пектин при рН 5,0 расщепляется полигалактуроназой и при нанесении на поверхность мицелиальной колонии раствора гексадецила нерасщепленный пектин выпадает в осадок. В зоне активности фермента среда остается прозрачной.

Пектаттрансэлиминаза. Н., ч.П., регистрация изменения прозрачности среды через 1 ч и 24 ч. Среда: к ГПДА добавляли 5 г пектина, 2,24 г tris и 2,32 г малеиновой кислоты, рН 7,0. Принцип: пектин при рН 7,0 расщепляется пектаттрансэлиминазой и при нанесении на поверхность мицелиальной колонии раствора гексадецила нерасщепленный пектин выпадает в осадок. В зоне активности фермента среда остается прозрачной.

Ксиланаза. Н., ч.П. Среда: к ПДА добавляли 2,5 г ксилана, рН 7,0. Ксилан расщепляется ксиланазой и после обработки среды 96%-м этанолом в зоне активности фермента образовывались прозрачные зоны.

β-глюкозидаза. П., пр. Среда: к ГПДА добавляли 5 г арбутина и 1 г дрожжевого экстракта. Среду разливали в пробирки, стерилизовали и в каждую пробирку добавляли несколько капель стерильного раствора FeCl₃. Принцип: арбутин расщепляется β-глюкозидазой, в результате чего высвобождается гидрохинон, который с солью железа образует комплекс бурого цвета, характеризующий наличие активности β-глюкозидазы.

Ферменты обмена азотных соединений

Протеаза. П., ч.П. Среда: раствор А – 900 мл ГПДА, Б – 6 г желатина растворяли в 100 мл воды. Растворы А и Б стерилизовали отдельно, охлаждали до 45 °С и смешивали.

Наличие активности протеазы подтверждалось появлением прозрачных зон вокруг мицелиальной колонии или под ней через 3 ч или на следующие сутки.

Нитратредуктаза. Н., пр. Среда: к 1000 мл ГПДА добавляли 15 г NaNO_3 , рН 7,4. Контроль – ГПДА. Принцип: нитрат натрия под воздействием нитратредуктазы превращается в нитрит, при добавлении растворов сульфаниловой кислоты и α -нафтиламина образуется соединение ярко-розового цвета. Раствор А: 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяли в 150 мл 5 н. уксусной кислоты. Раствор Б: 0,1 г α -нафтиламина растворяли в 20 мл H_2O (дистиллированной) и доводили до 150 мл 5 н. уксусной кислотой. В пробирки добавляли по 0,2 мл раствора А и Б и наблюдали за изменением окраски среды, ее интенсивность сравнивали с таковой у контроля. Конечным результатом служила разница в интенсивности окраски. Изменение окраски регистрировали через 10 и 60 мин.

Уреаза. П., пр. Среда: до 1000 мл ГПДА добавляли NaCl – 5 г, KH_2PO_4 – 2 г и фенола красного – 0,012 г, после стерилизации добавляли стерильный 20%-й раствор мочевины, рН 5,2. Принцип: при активности уреазы мочевина превращалась в аммоний, что вело к изменению рН среды. В зоне активности фермента регистрировали появление розовой окраски.

Липаза. П., пр. Среда: 1000 мл ГПДА + 0,5 г CaCl_2 и 10 мл Tween 80, рН 6,0, применяли пробирки с нескошенным агаром. Принцип: под воздействием липазы в среде происходит омыление соединений Tween 80 с хлоридом кальция (CaCl_2), которые выпадают в осадок белого цвета вокруг или под колонией гриба.

2.5. Статистическая обработка полученных результатов

Для получения достоверных результатов экспериментальные исследования в зависимости от условий анализа и требований математического планирования осуществляли в 3–5 повторностях. Достоверные значения полученных данных вычисляли статистическими методами анализа и находили такие показатели: значения средних квадратичных отклонений, коэффициентов вариаций, достоверных интервалов. В таблицах приведены средние статистически достоверные данные при 95%-й вероятности.

Для статистической обработки полученных результатов использовали компьютерные программы – прикладной пакет Microsoft Excel 2000 и Sigma Stat 2.0.

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДОВ РОДА *MORCHELLA* НА АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

При решении вопросов систематики макромицетов в современной микологии в качестве дополнительных характеристик используются культурально-морфологические особенности вегетативной стадии развития этих грибов (Бухало, 1988; Nobles, 1971; Stalpers, 1978). Поэтому разработка критериев, позволяющих надежно идентифицировать в культуре конкретные виды, приобретает большое значение в связи с расширением работ по биотехнологическому использованию культур макромицетов.

Рост исследованных культур на агаризованных питательных средах

До нашего исследования для большинства видов рода *Morchella* сведения о скорости роста вегетативного мицелия, морфологических особенностях мицелиальной колонии отсутствовали или были недостаточными. Практически неисследованной оставалась изменчивость отдельных культуральных признаков на питательных средах различного состава. Проведенное нами изучение культурально-морфологических особенностей определенных видов рода *Morchella* на стандартных питательных средах позволило нам сравнить данные, приводимые разными исследователями, и получить свои результаты.

В чистой культуре мы исследовали 26 штаммов 8 видов рода *Morchella* на шести разных по составу агаризованных питательных средах (СА, МЕА, КДА, ЧА, ОМДА, КА). Рост колоний на каждой среде оценивали по радиальной скорости роста (V_R). Нами были использованы также дополнительные показатели (плотность и высота колонии), что дало возможность охарактеризовать пригодность каждой среды для роста вегетативного мицелия, формирования склероциев и оценить целесообразность ее использования.

Определена радиальная скорость роста культур на агаризованных средах и установлена зависимость этого показателя от состава питательных сред. Для 66 % исследованных штаммов максимальную скорость роста обеспечивала только одна среда – ЧА, например для всех штаммов *M. conica*, *M. crassipes*, *M. steppicola* и половины штаммов *M. esculenta*. Наиболее высокие показатели ($18,2 \pm 0,3$ – $18,7 \pm 0,7$ мм/сут) отмечены у штаммов *M. esculenta* 1746, 1748 и 1805. Богатые органические среды СА, МЕА, КДА обеспечивали максимальные значения радиальной скорости роста только для незначительного числа культур (табл. 2). У 23% культур максимальное значение радиальной скорости роста отмечено на двух средах одновременно: *M. esculenta* 1744 (МЕА и КДА), *M. esculenta* 1753 (СА и МЕА), *M. esculenta* 1820 (КДА и ЧА) (см. табл. 2). У штамма *M. esculenta* 1840 максимальную скорость роста обеспечивали три среды: СА, КДА и ЧА. Для *M. elata* на всех исследованных средах отмечен очень медленный рост, что согласуется с данными, опубликованными Р. Вандером (Winder, 2006).

Полученные нами данные о радиальной скорости роста свидетельствуют о том, что культуры *M. esculenta*, *M. conica* 1737 и *M. steppicola* не уступают по значениям этого показателя некоторым видам высших базидиомицетов, таким как *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn, *Volvariella volvaceae* (Bull.) Singer, *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst., которые относятся к группе быстрорастущих грибов ($V_R \geq 12$ мм/сут) (Ломберг, 2005). Большинство же исследованных видов *M. angusticeps*, *M. crassipes*, *M. spongiola*, *M. elata*, *M. semilibera* по значениям скорости радиального роста близки к таким базидиомицетам: *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr., *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Schizophyllum commune* Fr.: Fr., *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr., *Pleurotus cystidiosus* O.K. Miller, *Panus conchatus* (Bull.) Fr., которые относятся к группе грибов, растущих со средней скоростью (Соломко та ін., 2000; Дзигун, 2005; Ломберг, 2005).

В связи с этим прослеживается определенная видовая закономерность. Виды *M. angusticeps*, *M. semilibera*, *M. elata*, *M. spongiola* росли медленнее по сравнению с *M. conica*, *M. esculenta*.

Таблица 2. Скорость радиального роста колоний (V_R , мм/сут) исследованных штаммов на агаризованных питательных средах разного состава при температуре 26 ± 1 °C

Вид	Штамм	Питательная среда					
		СА	МЕА	КДА	ЧА	ВМДА	КА
<i>Morchella angusticeps</i>	1833	3,3 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,38 ± 0,1	6,5 ± 0,3	9,8 ± 0,2	10,1 ± 0,3
<i>M. conica</i>	1737	12,7 ± 0,1	15,2 ± 0,2	14,1 ± 0,1	17,1 ± 0,2*	15,9 ± 0,4	12,7 ± 0,4*
	1738	8,9 ± 0,2	8,0 ± 0,3	6,6 ± 0,1	12,5 ± 0,6*	8,3 ± 0,5	7,4 ± 0,1*
	1739	9,1 ± 0,1	8,4 ± 0,7	6,2 ± 0,6	13,2 ± 0,2*	10,4 ± 0,8	9,7 ± 0,1*
	1835	7,9 ± 0,1*	7,8 ± 0,2	8,9 ± 0,4	10,8 ± 0,1*	8,7 ± 0,1	8,0 ± 0,2
<i>M. crassipes</i>	1834	7,7 ± 0,3	4,8 ± 0,4	4,2 ± 0,3	9,9 ± 0,2*	8,2 ± 0,3*	5,4 ± 0,2
	1851	6,5 ± 0,2	6,8 ± 0,1	6,2 ± 0,3	10,4 ± 0,1*	9,2 ± 0,2*	5,2 ± 0,1
<i>M. elata</i>	1891	3,5 ± 0,3*	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,3	2,8 ± 0,2*	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,4
<i>M. esculenta</i>	1744	14,1 ± 0,2	15,7 ± 0,5	15,5 ± 0,1	13,9 ± 0,2	11,6 ± 0,4*	6,1 ± 0,2*
	1746	16,2 ± 0,1	13,5 ± 0,4	13,1 ± 0,4	18,7 ± 0,3*	14,2 ± 0,1*	11,5 ± 0,1*
	1747	13,5 ± 0,2	13,4 ± 0,1	18,2 ± 0,1	17,3 ± 0,4*	10,6 ± 0,5*	6,1 ± 0,2
	1748	14,6 ± 0,3	12,5 ± 0,2	11,8 ± 0,8	18,7 ± 0,7*	15,4 ± 0,4*	9,8 ± 0,3*
	1749	15,1 ± 0,1	17,1 ± 0,3	9,1 ± 0,4	13,7 ± 0,4	12,8 ± 0,1	9,7 ± 0,3*
	1750	12,2 ± 0,1	12,7 ± 0,5	15,5 ± 0,1	14,0 ± 0,2*	18,8 ± 0,3*	11,7 ± 0,1

<i>M. esculenta</i>	1753	15,2 ± 0,2	14,3 ± 0,9	13,1 ± 0,7	13,6 ± 0,3	11,87 ± 0,2*	10,5 ± 0,5*
	1755	16,4 ± 0,1	15,3 ± 0,2	10,6 ± 0,5	17,9 ± 0,7*	15,8 ± 0,3*	11,5 ± 0,3*
	1805	14,8 ± 0,1	15,8 ± 0,4	14,2 ± 0,2	18,2 ± 0,3*	18,1 ± 0,1*	11,2 ± 0,2
	1820	14,3 ± 0,3	15,7 ± 0,1	17,5 ± 0,5	17,7 ± 0,3*	14,5 ± 0,4*	10,2 ± 0,5*
	1843	11,1 ± 0,2	11,2 ± 0,1	11,8 ± 0,2	12,5 ± 0,2*	10,7 ± 0,2	9,5 ± 0,1
	1844	12,7 ± 0,1	11,8 ± 0,1	12,4 ± 0,4	12,8 ± 0,1	9,9 ± 0,1*	10,3 ± 0,4
<i>M. semilibera</i>	1740	3,9 ± 0,2	1,5 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,3*	8,3 ± 0,2*	2,3 ± 0,3
	1846	3,5 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,6 ± 0,1*	2,1 ± 0,2*	1,1 ± 0,2
<i>M. spongiola</i> ,	1837	7,4 ± 0,2	7,9 ± 0,2	7,3 ± 0,1	8,9 ± 0,2	7,5 ± 0,1*	6,0 ± 0,4
	1838	7,1 ± 0,3	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,2	6,3 ± 0,3	5,5 ± 0,2*	5,2 ± 0,3*
	1850	6,6 ± 0,2	5,9 ± 0,1	6,1 ± 0,2	6,2 ± 0,1	4,4 ± 0,1*	4,0 ± 0,2
<i>M. steppicola</i>	1849	12,3 ± 0,1	12,4 ± 0,2	12,8 ± 0,1	14,1 ± 0,2	11,7 ± 0,4*	11,9 ± 0,1

П р и м е ч а н и я . Жирным шрифтом отмечена статистически достоверная максимальная скорость радиального роста; * – наблюдалось формирование склероциев.

Использование чистых культур макромицетов в качестве промышленных продуцентов требует также исследования влияния различных факторов культивирования на биологические свойства этих грибов. Одним из вопросов, которому ранее не уделялось внимание, является изменение биологических особенностей культур рода *Morchella* при продолжительном культивировании, связанном с многократными пассажами на агаризованных питательных средах.

При проведении морфологических, культуральных и физиологических исследований видов рода *Morchella* используют различные агаризованные питательные среды (Куткова, Сухомлин, 2005, 2006; Hervey et al., 1978; Volk, Leonard, 1989; Buscot, 1993; Stamets, 2000; Masaphy, 2004; Winder, 2006). Многие авторы отмечают, что вегетативный мицелий этой группы грибов быстро вырождается в культуре при длительном хранении (Hervey et al., 1978; Volk, Leonard, 1989; Buscot, 1993; Stamets, 2000). Согласно данным литературы, авторы указанных публикаций используют питательные коммерческие среды MEA и КДА.

Нами изучено влияние многократных пассажей (15) на рост и морфологические особенности *M. esculenta* 1755 как перспективного продуцента пищевой биомассы. Культивирование проводили на СА в чашках Петри, пересев – каждые 7 суток. Учитывали скорость радиального роста, описывали морфологию колонии, проводили постоянный контроль микроморфологии вегетативного мицелия. В ходе исследования отмечено, что на протяжении периода культивирования (более 3 мес) все показатели были стабильными.

Результаты нашего исследования дают основание рекомендовать СА как среду для хранения культур изученных грибов при определенных эталонных условиях в коллекции. Эта среда обеспечивает хороший рост вегетативного мицелия, и культуры сохраняют свои физиологические и морфологические свойства во время длительного хранения в условиях коллекции.

Морфология колоний

При проведении культуральных исследований основное внимание уделялось характеристике мицелиальных колоний: их текстуре, окраске, воздушному мицелию, наличию склероциев

и т.д. Среди видов рода *Morchella* морфология колоний наиболее полно была описана для *M. esculenta*, *M. angusticeps*, *M. steppicola* (Куткова, Сухомлин, 2005, 2006; Hervey et al., 1978; Volk, Leonard, 1989; Buscot, 1993; Stamets, 2000; Masaphy, 2004). Однако недостаточно изученной остается изменчивость морфологических особенностей, в первую очередь формирование склероциев на разных питательных средах. Для исследованных видов мы приводим полную морфологическую характеристику колоний на всех использованных в работе питательных средах (табл. 3).

Для изучаемой группы грибов характерной является способность формировать в природе и чистой культуре склероции, которые, по мнению некоторых авторов, помогают грибам переносить неблагоприятные экологические условия и являются необходимой стадией развития при образовании плодовых тел (Ower et al., 1986, 1988, 1989; Buscot, 1989; Buscot, Bernillon, 1991).

1) Ряд авторов отмечают, что формирование склероциев в чистой культуре зависит от того, насколько определенная среда обеспечивает потребности грибного организма источниками питания (Amir et al., 1992-1995; Levanov et al., 1992). В результате проведенных нами исследований установлена изменчивость морфологических признаков мицелиальных колоний в зависимости от состава питательных агаризованных сред. Все изученные культуры формировали два основных типа колоний:

2) колонии плотные, войлочные или шерстистые, с хорошо развитым воздушным мицелием, разнообразно окрашенные (сероватые, бежевые, кремовые, песочные, коричневые), без склероциев или с незначительным количеством очень мелких склероциев;

3) колонии паутинистые, прозрачные, разнообразно окрашенные (сероватые, бежевые, кремовые, песочные, коричневые), практически без воздушного мицелия, с большим количеством склероциев.

Однако следует отметить, что между этими двумя типами существует много промежуточных вариаций.

Таблица 3. Морфологическая характеристика колоний исследованных видов на агаризованных питательных средах разного состава

Вид	Питательная среда					
	СА	МЕА	КДА	ЧА	ОМДА	КА
1	2	3	4	5	6	7
<i>Morchella angusticeps</i>	Колонии плотные, шерстистые, в начале белые, со временем сероватые или светло-коричневого цвета, с короткими спутанными воздушными гифами, без склероциев; край ровный; реверзум темно-коричневый	Колонии средней плотности, войлочные, в начале белые, со временем светло-коричневые, без склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум темно-коричневый	Колонии плотные, войлочные, сероватые или коричневые, без склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум темно-коричневый	Колонии паутинистые, прозрачные, кремового цвета, с небольшим количеством склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум коричневый	Колонии средней плотности, войлочные, кремовые, с небольшим количеством мелких склероциев по всей площади колонии; край неровный, прижатый к субстрату; реверзум темно-серый	Колонии очень паутинистые, прозрачные, с небольшим количеством воздушных гиф, кремовые, склероциии единичные; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум коричневый

<p><i>Morchella conica</i></p>	<p>Колонии прозрачные, паутинистые, с возрастом сероватые или светло-коричневые, с большим количеством склероциев, которые сливаются между собой, образуя твердую корку; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии средней плотности, войлочные, с возрастом сероватые или светло-коричневые, с небольшим количеством мелких склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии средней плотности, войлочные, с возрастом коричневые, с небольшим количеством мелких склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум песчаного цвета</p>	<p>Колонии прозрачные, паутинистые, с большим количеством склероциев по всей площади колонии. Склероции сливаются между собой, образуя твердую корку; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум кремовый</p>	<p>Колонии плотные, войлочные с воздушным ватообразным или шерстистым мицелием, с возрастом сероватые, без склероциев; край приподнятый над субстратом; реверзум светло-кремовый</p>	<p>Колонии прозрачные паутинистые, белые, с возрастом сероватые, с небольшим количеством одиночных склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>
--------------------------------	--	--	---	--	--	--

Продолжение табл. 3

<p><i>Morchella crassipes</i></p>	<p>Колонии плотные, войлочные, с воздушным ватообразным или шерстистым мицелием, коричневого цвета, без склероциев; край приподнятый; реверзум темно-каштановый</p>	<p>Колонии средней плотности, войлочные, светло-коричневые, с небольшим количеством мелких склероциев по всей площади колонии; край, прижатый к субстрату; реверзум темно-каштановый</p>	<p>Колонии средней плотности, войлочные, с возрастом сероватые или кремовые, без склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум темно-коричневый</p>	<p>Колонии войлочные, серого или кремового оттенка, со склероциями по всей площади колонии; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум коричневый</p>	<p>Колонии войлочные, с возрастом кремовые, с большим количеством склероциев в центре колонии; край, прижатый к субстрату; реверзум темно-каштановый</p>	<p>Колонии паутинистые, прозрачные, сереватые, без склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум темно-каштановый</p>
-----------------------------------	---	--	---	--	--	---

<p><i>Morchella elata</i></p>	<p>Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом коричневые, с одиночными склероциями по всей площади колонии; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии средней плотности, войлочные, с возрастом светло-коричневые, с небольшим количеством мелких склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии средней плотности, войлочные, с возрастом коричневые, с небольшим количеством мелких склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии паутинистые, с большим количеством склероциев, которые сливаются между собой, образуя твердую корку; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум кремовый</p>	<p>Колонии плотные, войлочные, с длинными спутанными воздушными гифами, с возрастом сероватые; без склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум кремовый</p>	<p>Колонии средней плотности, войлочные, с возрастом сероватые с небольшим количеством одиночных склероциев; край ровный, прижатый; реверзум коричневый</p>
-------------------------------	---	--	---	--	---	---

<i>Morchellast eppicola</i>	Колонии плотные, шерстистые, с длинными спутанными воздушными гифами, с возрастом кремовые или светло-коричневые, без склероциев или с незначительным количеством мелких склероциев; край ровный; реверзум темно-коричневый	Колонии плотные, шерстистые, с длинными спутанными воздушными гифами, с возрастом кремовые или светло-коричневые, без склероциев или с незначительным количеством мелких склероциев; край ровный; реверзум коричневый	Колонии плотные, шерстистые, с длинными спутанными воздушными гифами, с возрастом кремовые или светло-коричневые, без склероциев склероциев; край ровный; реверзум коричневый	Колонии средней плотности, с небольшим количеством слабо развитых воздушных гиф, кремовые, с одиночными склероциями; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум коричневый	Колонии плотные, шерстистые, с длинными спутанными воздушными гифами, с возрастом кремового цвета, с небольшим количеством одиночных склероциев; край ровный; реверзум светло-коричневый	Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом светло-коричневые, с небольшим количеством мелких слероциев; край неровный приподнятый над субстратом; реверзум коричневый
-----------------------------	---	---	---	---	--	---

<i>Morchella esculenta</i>	Колонии плотные, шерстистые, с длинным и спутанными воздушными гифами, со временем темно-коричневые, без склероциев или с незначительным количеством мелких склероциев; край ровный; реверзум темно-каштановый	Колонии плотные, шерстистые, с длинными спутанными воздушными гифами, с возрастом кремовые, без склероциев; край ровный, прижатый к субстрату; реверзум темно-каштановый	Колонии плотные шерстистые, в центре с короткими спутанными воздушными гифами, светло-коричневые, по краю колонии расположены одиночные склероции; край ровный; реверзум темно-каштановый	Колонии, паутинистые, с возрастом коричневые, с многочисленными мелкими склероциями, по всей площади колонии; край ровный; реверзум темно-каштановый	Колонии, паутинистые, с большим количеством мелких склероциев, которые сливаются между собой, образуя твердую корку; край ровный; реверзум темно-каштановый	Колонии шерстистые с короткими воздушными гифами, с возрастом светло-коричневые, с небольшим количеством мелких склероциев; край ровный; реверзум темно-каштановый
----------------------------	--	--	---	--	---	--

<p><i>Morchella semilibera</i></p>	<p>Колонии средней плотности, шерстистые, с возрастом кремовые или сероватые, с небольшим количеством мелких склероциев; край неровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом светло-коричневые, без склероциев или с небольшим количеством мелких склероциев; край неровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом коричневые, без склероциев; край неровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом светло-коричневые, с одиночными немногочисленными склероциями; край неровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии шерстистые, с возрастом коричневые, без склероциев; край неровный, прижатый к субстрату; реверзум светло-коричневый</p>	<p>Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом светло-коричневые, без склероциев; край неровный, прижатый к субстрату; реверзум коричневый</p>
------------------------------------	--	--	---	--	--	---

<i>Morchella spongiola</i>	Колонии плотные, шерстистые с короткими спутанными воздушными гифами, с возрастом светло-коричневые, без склероциев; край ровный, прижатый; реверзум коричневый	Колонии плотные, шерстистые с короткими спутанными воздушными гифами, с возрастом светло-коричневые, без склероциев; край ровный, прижатый; реверзум коричневый	Колонии плотные, войлочные со спутанными воздушными гифами, с возрастом светло-коричневые, без склероциев; край ровный, прижатый; реверзум коричневый	Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом кремовые, с небольшим количеством одиночных склероциев; край ровный, прижатый; реверзум коричневый	Колонии плотные, войлочные со спутанными воздушными гифами, с возрастом светло-коричневые, без склероциев; край ровный, прижатый; реверзум коричневый	Колонии паутинистые, прозрачные, с возрастом светло-коричневые, с небольшим количеством мелких склероциев; край ровный, прижатый; реверзум коричневый
----------------------------	---	---	---	---	---	---

Окраска всех колоний в первые сутки роста была белая, затем она приобретала серые или коричневые тона. В отдельных случаях колония сохраняла оттенок, характерный для плодовых тел определенного вида. Так, колонии коричневого цвета наблюдались у изолятов *M. esculenta*, *M. crassipes*, *M. spongiola* и *M. steppicola*.

Во время роста культур *M. crassipes*, *M. esculenta*, *M. spongiola* и *M. steppicola* цвет реверзума изменялся до различных оттенков коричневого при культивировании на всех исследованных питательных средах.

Высота и плотность колоний, а также формирование или отсутствие склероциев варьировали в зависимости от состава питательных сред. Так, *M. esculenta*, *M. angusticeps*, *M. steppicola*, *M. crassipes* и *M. spongiola* формировали колонии первого типа на средах СА, МЕА, КДА.

Для *M. conica*, *M. elata*, *M. semilibera* наиболее благоприятными для формирования колоний со склероциями были СА и ЧА (рис. 3). Исследованные культуры *M. angusticeps*, *M. crassipes*, *M. spongiola*, а также 80% штаммов *M. esculenta* формировали склероции на ОМДА и ЧА.

Наименее благоприятной для культивирования была среда КА, на которой формировались паутинистые колонии, с незначительным количеством склероциев или без них. Р. Майер (цит. по: Vuscot, 1993) на основе морфологических признаков выделил два основных типа склероциев, которые формируются в чистой культуре на агаризованных питательных средах. Первый тип склероциев получил условное название "ранние инкрустированные склероции" (EES), они формируются после полной колонизации субстрата вегетативным мицелием. Одновременно образуется очень большое количество склероциев, особенно по краю мицелиальной колонии. Склероции не превышают в диаметре 0,2-0,5 мм, очень часто сливаются между собой, меняют окраску с белого на темно-коричневый. Склероции второго типа начинают формироваться после 12 сут культивирования. Их количество незначительно, они изолированы друг от друга и формируются по всей площади мицелиальной колонии, размер их в диаметре 5-8 мм.

Этот тип получил условное название "поздние изолированные склероции" (LIS), они формируются при температуре

выше 20 °С, тогда как EES при 10 °С. Р. Майер (цит. по: Buscot, 1993) на основе морфологических признаков выделил два основных типа склероциев, которые формируются в чистой культуре на агаризованных питательных средах. Первый тип склероциев получил условное название “ранние инкрустированные склероции” (EES), они формируются после полной колонизации субстрата вегетативным мицелием. При этом образуется очень большое количество склероциев, особенно по краю мицелиальной колонии.

Склероции не превышают в диаметре 0,2–0,5 мм, очень часто сливаются между собой, меняют окраску с белого на темно-коричневый. Склероции второго типа начинают формироваться после 12 сут культивирования. Их количество незначительно, они изолированы друг от друга и формируются по всей площади мицелиальной колонии, размер их в диаметре 5-8 мм. Этот тип получил условное название “поздние изолированные склероции” (LIS), формируются они при температуре выше 20 °С, тогда как EES при 10 °С.

По мнению некоторых авторов (Ower, 1982; Ower et al., 1986; 1988; 1989; Volk, Leonard, 1990), склероции выполняют важную регулирующую роль при формировании плодовых тел. Ф. Баскот и Дж. Берллион (Buscot, Bernillon, 1991), изучая связь между плодоношением и склероциями *M. esculenta*, проанализировали содержание микоспоринов в склероциях, которые они получили в чистой культуре, в склероциях из естественных природных условий и в плодовых телах. Микоспорины принадлежат к веществам, которые имеют морфогенетическое действие и тесно связаны с репродуктивными органами грибов, в том числе у аскомицетов.

Отмечено, что вегетативный мицелий *M. esculenta* не содержал микоспорины, тогда как в гимении зрелых аскокарпов его содержание было значительным. Кроме того, было установлено, что первый тип склероциев (EES – ранние инкрустированные склероции) по содержанию микоспоринов и своему биохимическому составу подобен молодым плодовым телам, а второй тип (LIS) – природным подземным склероциям.

Как показали наши исследования, виды *M. esculenta*, *M. angusticeps*, *M. crassipes*, *M. spongiola* формировали колонии первого типа на богатых питательных средах – СА, МЕА, КДА, а

склероции образовывались на ВМДА и ЧА. Для *M. conica*, *M. elata*, *M. semilibera* формирование колоний второго типа наблюдалось на бедной синтетической среде ЧА и на богатой комплексной среде СА. Для штаммов *M. conica* 1738 и *M. semilibera* 1846 среда ВМДА оказалась неблагоприятной для образования склероциев, на ней наблюдалось формирование плотных мицелиальных колоний с обильным воздушным мицелием, без склероциев.

Все исследованные виды формировали в культуре склероции, которые по классификации А. Майера (цит. по: Buscot, 1993) можно отнести к типу EES.

Согласно данным литературы (Amir et al., 1992-1995; Levanov et al., 1992), колонии с хорошо развитым воздушным мицелием формируются на богатых органическими веществами средах, а формированию склероциев благоприятствуют среды, которые содержат недостаточное количество питательных веществ, необходимых для нормального физиологического развития вегетативного мицелия. Это подтверждено специальными исследованиями с использованием радиоактивного углерода ¹⁴C. Описаны четыре стадии формирования склероциев, в течение которых происходит увеличение их массы и значительное уменьшение количества вегетативного мицелия, что, по мнению авторов, убедительно демонстрирует зависимость формирования склероциев и роста вегетативного мицелия от количества и состава источников питания. Так, в работах А. Филиппоуссиса и С. Валеса (Philippoussis, Balis, 1995), С. Синга и Р. Верма (Singh, Verma, 2000) для получения склероциев приведены составы органических субстратов, богатых питательными веществами.

Наиболее точно рост грибов можно оценить по накоплению биомассы, что используется при культивировании на жидких питательных средах, но не представляется возможным на агаризованных.

Для более полной характеристики роста культур на агаризованных питательных средах мы использовали дополнительные показатели роста колонии: время колонизации субстрата (сутки), высоту мицелиальной колонии (мм) и ее плотность (баллы). Это дало нам возможность охарактеризовать пригодность определенной среды для вегетативного роста той или иной культуры, а также рекомендовать среды для хранения и получения посевного мицелия.

Исследованные культуры на средах разного состава отличались временем колонизации субстрата, плотностью и высотой колонии. Наиболее быстро колонизировали субстрат и образовывали высокие и плотные колонии культуры *M. esculenta* 1749, 1755, 1805, 1820, *M. steppicola* 1849 на СА, МЕА, КДА, *M. conica* 1737 – на ВДМА. Медленный рост на всех средах отмечен у *M. semilibera* 1740, 1846. Культуры *M. esculenta* 1744, 1746, 1747, 1748, 1750, 1753, *M. crassipes* 1834, 1851, *M. spongiola* 1837, 1838 – на СА, МЕА, КДА, *M. conica* 1738, 1739 и 1835 – на ВДМА заняли промежуточное положение по времени полного обрастания субстрата и имели средние значения плотности колоний.

Таким образом, при изучении роста 26 штаммов, относящихся к 8 видам рода *Morchella*, показаны значительные различия в скорости роста отдельных видов на разных питательных средах при 28 °С. Для большинства исследованных нами культур были характерны максимальные значения радиальной скорости роста на синтетической среде ЧА. Учитывая дополнительные показатели роста колонии (высоту и плотность), эту среду нельзя рекомендовать для вегетативного размножения и хранения культур грибов исследованной группы.

Установлена значительная вариабельность морфологии колоний одного и того же штамма на средах определенного состава, колонии отличались окраской и текстурой, а также способностью формировать склероции. Для каждого штамма подобраны агаризованные среды, благоприятные для роста вегетативного мицелия или формирования склероциев.

Влияние температуры инкубации на рост и морфологию культур

Мицелий грибов развивается в природных и искусственных условиях при определенной температуре. Зависимость роста и морфогенеза культур видов рода *Morchella* от температурного фактора остается недостаточно изученной. Большинство опубликованных работ по этому вопросу касается наблюдений за появлением и развитием плодовых тел только нескольких видов этого рода в природных условиях (Singer, Harris, 1987; Buscot, 1993; Stamets, 2000), а также *M. esculenta* и *M. elata* при культивировании на питательных средах различного состава и

растительных субстратах (Ower, 1982; Ower et al., 1985, 1988, 1989; Buscot, Bernillon, 1991).

В связи с этим представляло интерес определить температурные границы и благоприятные температуры для роста культур нашей группы грибов.

Нами исследован рост и морфология культур при температуре 4 ± 1 °С, где лежит нижний предел развития большинства грибов; 18 ± 1 °С; 26 ± 1 °С, т.е. в пределах оптимума мицелиального роста и 34 ± 1 °С, являющимся для большинства высших грибов максимальной границей роста. Все исследованные виды можно отнести к группе мезофильных грибов, оптимум роста которых находится в пределах 20-30 °С.

У всех культур рост мицелия наблюдался при температуре 4-34 °С. Максимальная скорость роста – при 26 °С (табл. 4). Температура, которая обеспечивала наивысшие показатели роста вегетативного мицелия, является важной характеристикой конкретных штаммов и должна быть учтена при дальнейшем использовании культур.

Наиболее быстрорастущими оказались штаммы *M. esculenta* 1746, 1749 и 1755, *M. conica* 1737, *M. steppicola* 1849 (от $12,7\pm 0,1$ до $16,4\pm 0,1$ мм/сут). Медленный рост (до $3,3\pm 0,2$ мм/сут) отмечен у *M. angusticeps* *M. semilibera*. Мицелий всех видов слабо рос при температуре 4 °С, значения радиальной скорости роста при этом не превышали $3,8\pm 0,3$ мм/сут даже у наиболее быстрорастущих штаммов. Способность расти при температуре 4 °С характерна грибам умеренной климатической зоны, к которым и относятся исследованные нами виды.

При температуре 34 ± 1 °С у *M. angusticeps*, *M. semilibera* наблюдался слабый мицелиальный рост на инокуляте только первые 2-3 суток. У *M. esculenta*, *M. conica*, *M. crassipes* и *M. steppicola* хотя и развивались мицелиальные колонии, их диаметр не превышал 15–25 мм, после чего рост прекращался. Если культуру переносили в термостат с оптимальной температурой (26 ± 1 °С), то штаммы *M. steppicola* 1849, *M. spongicola* 1837 и 1838, *M. crassipes* 1834, *M. esculenta* 1805, 1746, 1755 и 1844 возобновляли рост, другие культуры утрачивали свою жизнеспособность.

Таблица 4. Скорость радиального роста исследованных культур при различных температурах инкубации

Вид	Штамм	Скорость радиального роста, мм/сут		
		4 ± 1 °С	18 ± 1 °С	26 ± 1 °С
<i>Morchella angusticeps</i>	1833	1,2 ± 0,2	2,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2
<i>M. conica</i>	1737*	2,7 ± 0,3	9,5 ± 0,2	12,7 ± 0,1
	1738*	2,9 ± 0,4	7,1 ± 0,1	8,9 ± 0,2
	1739*	2,2 ± 0,3	6,5 ± 0,1	9,1 ± 0,1
<i>M. crassipes</i>	1834	2,2 ± 0,2	5,1 ± 0,2	7,7 ± 0,3
	1851	1,9 ± 0,3	4,5 ± 0,2	6,5 ± 0,2
<i>M. elata</i>	1891*	0,7 ± 1,1	2,8 ± 0,4	3,5 ± 0,3
<i>M. esculenta</i>	1744	3,1 ± 0,4	5,6 ± 0,3	14,1 ± 0,2
	1746*	3,8 ± 0,3	7,1 ± 0,2	16,2 ± 0,1
	1747	3,5 ± 0,3	7,5 ± 0,1	13,5 ± 0,2
	1748*	3,1 ± 0,2	5,0 ± 0,1	14,6 ± 0,3
	1749	3,3 ± 0,4	6,0 ± 0,2	15,1 ± 0,1
	1750	2,7 ± 0,5	5,4 ± 0,3	12,2 ± 0,1
	1753*	2,2 ± 0,2	6,1 ± 0,2	15,2 ± 0,2
	1755	2,8 ± 0,3	5,7 ± 0,1	16,4 ± 0,1
	1805	1,4 ± 0,2	4,4 ± 0,3	14,8 ± 0,1
	1820	1,9 ± 0,4	5,6 ± 0,3	14,3 ± 0,3
	1843	3,3 ± 0,2	6,0 ± 0,2	11,1 ± 0,2
1844	3,2 ± 0,3	4,3 ± 0,1	12,7 ± 0,1	
<i>M. semilibera</i>	1740*	0,7 ± 0,5	1,4 ± 0,4	4,9 ± 0,2
	1846*	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,6	4,5 ± 0,3
<i>M. spongiosa</i>	1837	1,5 ± 0,4	3,1 ± 0,2	7,4 ± 0,2
	1838	2,1 ± 0,2	3,6 ± 0,4	7,1 ± 0,3
	1850	1,8 ± 0,6	3,4 ± 0,5	6,6 ± 0,2
<i>M. steppicola</i>	1849	2,2 ± 0,4	9,5 ± 0,2	12,3 ± 0,1

* – Наблюдалось формирование склероциев.

Таким образом, в результате исследования установлена зависимость радиальной скорости роста от температуры инкубации. Наиболее благоприятной температурой, обеспечивающей максимальную скорость роста вегетативного

мицелия у всех исследованных штаммов, была температура 26 ± 1 °С. При этом температурный фактор не влиял на морфологию мицелиальных колоний и формирование склероциев, культуры сохраняли свои характерные морфо-логические признаки при культивировании в интервале $4-26 \pm 1$ °С.

Наличие ферментов разных классов в культурах исследованных видов

Грибы, растущие в природе на различных субстратах, способны модифицировать их и использовать для воспроизведения своих ростовых и энергетических потребностей.

Исследование ферментов грибов необходимо для понимания их физиологии, биохимии, экологии, а также установления признаков, которые могут быть использованы как дополнительные таксономические критерии (Хочачка, 1977; Бухало, 1988; Даниляк и др., 1989; Stalpers, 1978). Ферментативный аппарат видов рода *Morchella* практически не исследован. Сморчки относятся к гумусовым сапротрофам и как гетеротрофные организмы получают все необходимые питательные вещества из субстрата. В биоценозах они являются деструкторами разнообразных биополимеров.

Нами исследовано 30 штаммов 8 видов рода *Morchella* на наличие энзимов обмена азотных (протеаза, нитрат-редуктаза, уреазы), углеродных соединений (амилаза, целлюлоза, ксиланаза, β -глюкозидаза), окислительно-восстановительных процессов (монофенол-монооксигеназы, пероксидаза) и обмена липидов (липаза).

Наличие окислительно-восстановительных ферментов

Лакказа. При помощи тестовых цветных реакций изучена способность исследованных культур выделять в среду экзоточные окислительные ферменты. Все исследованные нами культуры обнаружили положительную реакцию на наличие лакказы. В отдельных случаях наблюдались различия в скорости окрашивания колоний или его интенсивности, однако характер реакций для каждого вида при всех испытанных условиях был постоянен. У *M. conica*, *M. semilibera* позитивная

реакция на этот фермент проявилась в первые сутки после инокуляции – наблюдалось фиолетовое окрашивание среды с α -нафтолом и темно-вишневое с гваяколом. Для штаммов *M. esculenta*, *M. crassipes*, *M. spongiola*, *M. steppicola* реакция начинала проявляться на 3-и сутки культивирования. Наиболее слабой была реакция у *M. elata*, *M. angusticeps*.

Тирозиназа. Позитивная реакция на тирозиназу четко наблюдалась у всех исследованных штаммов после 10 сут культивирования, т.к. продуцирование этого фермента клетками мицелия зависит от возраста колонии. Наиболее активными штаммами оказались *M. conica* 1739 и *M. esculenta* 1749, у остальных была менее интенсивная реакция.

Пероксидаза. В условиях нашего эксперимента ни один штамм не выявил четкой позитивной реакции на пероксидазу. Среди макромицетов ее образование наиболее распространено у дереворазрушающих базидиомицетов, что связано с их физиологическими особенностями питания.

Наличие ферментов обмена углеродных соединений

При помощи качественных цветовых реакций мы исследовали наличие внеклеточных ферментов: амилазы, ксиланазы, β -глюкозидазы и целлюлазы, которые способны разрушать в природе субстраты, содержащие разнообразные биополимеры.

Амилаза. Все исследованные нами культуры показали четкую позитивную реакцию на наличие амилазы. Она проявлялась в появлении прозрачной зоны вокруг или непосредственно под мицелиальной колонией после нанесения реагента. Причем в молодом мицелии отмечен более высокий уровень активности амилаз, чем в старых колониях. Наиболее активными были штаммы *M. conica*, у них зафиксирована зона активности фермента вокруг колонии шириною более 5 мм. У остальных видов эта зона регистрировалась только непосредственно под мицелиальной колонией.

Ксиланаза. Представители рода *Morchella* выявили слабую позитивную реакцию на этот фермент, однако такие виды, как *M. angusticeps*, *M. semilibera* не показали активности даже при длительном культивировании.

Целлюлаза. Целлюлоза разрушается ферментами, которые входят в целлюлозолитический комплекс, очень развитый у дереворазрушающих грибов и хотя сморчки принадлежат к гумусовым сапротрофам, все исследованные виды дали четкую позитивную реакцию на этот фермент. Вокруг колонии наблюдали прозрачную зону активности фермента, которая у некоторых штаммов отличалась шириной зоны распространения. Наибольшую активность проявили виды *M. conica*, *M. esculenta*, *M. steppicola*.

β-глюкозидаза. Все исследованные штаммы имели позитивную реакцию на наличие данного фермента. Реакция проявлялась уже на 3-и сутки после инокуляции. Под колонией наблюдали темно-бурое окрашивание субстрата, с возрастом колонии его интенсивность значительно усиливалась. Наиболее активными были культуры *Morchella semilibera* 1740, *M. esculenta* 1748, 1749 и 1820.

Наличие ферментов обмена азотных соединений

Метаболизм азотных соединений характеризовали установлением наличия внеклеточных протеазы, казеиназы, нитрат-редуктазы, уреазы.

Протеаза. Все исследованные нами культуры показали позитивную реакцию на наличие протеазы. Активность начинала проявляться после 5 сут культивирования штаммов. Слой питательной среды непосредственно под мицелиальной колонией становился прозрачным, что подтверждает наличие ферментативной активности. Однако вокруг колонии эта зона не наблюдалась, что свидетельствует о низкой активности протеазы у представителей исследуемой группы грибов. Разные штаммы одного и того же вида отличались между собой интенсивностью и временем протекания реакции, характер которой был позитивный. Наиболее активными были культуры видов: *M. conica*, *M. crassipes*, *M. esculenta*, *M. spongiosa*, *M. steppicola*.

Казеиназа. Наличие активности фермента регистрировали после 5 сут культивирования. Питательная среда непосредственно под мицелиальной колонией становилась прозрачной. Хотя штаммы одного и того же вида отличались между собой интенсивностью реакции, характер протекания ее, как правило,

был постоянным. Наиболее сильно активность проявилась у штаммов *M. conica* 1737, 1738, 1739, *M. esculenta* 1749, 1746. У видов *M. angusticeps*, *M. semilibera* даже после 30 сут культивирования позитивная реакция на наличие казеиназы не была выявлена.

Nitrat-редуктаза. Все исследованные штаммы показали четкую, позитивную реакцию на наличие внеклеточной нитрат-редуктазы, которая, как правило, отсутствует у высших базидиальных грибов (Бухало, 1988). Активность фермента регистрировалась в результате изменения цвета питательной среды вокруг мицелиальной колонии или непосредственно под ней (с желтого на ярко-розовый цвет). Все исследованные нами культуры обнаружили положительную реакцию на наличие нитрат-редуктазы. Наиболее активными были штаммы *M. esculenta* 1746, 1748, 1749, у которых активность проявилась сразу же после внесения реагентов на мицелиальную колонию и субстрат. У других культур изменение окрашивания субстрата регистрировалось через 10 мин после нанесения реагентов. Очень слабую активность проявили культуры видов *M. semilibera*, *M. elata*, *M. angusticeps*.

Уреаза. Позитивная реакция на уреазу установлена у всех исследованных штаммов. Активность фермента начинала проявляться после 6 сут культивирования. Вокруг колонии и под ней наблюдалось окрашивание питательной среды в ярко-розовый цвет, интенсивность которого увеличивалась с ростом колонии. Наиболее активными были культуры видов *M. esculenta*, *M. steppicola*.

Наличие ферментов обмена липидов

Все исследованные культуры показали четкую позитивную реакцию на наличие внеклеточной липазы. Реакцию фиксировали при выпадении белого осадка на 14-15-е сут после инокуляции среды мицелием гриба. При длительном культивировании интенсивность реакции значительно усиливалась.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что виды рода *Morchella* обладают достаточно широким спектром ферментов, с помощью которых они способны разлагать сложные соединения растительного происхождения (табл. 5).

Таблица 5. Наличие ферментов разных классов в культурах исследованных видов

Вид	Фермент							
	Амилаза	Целлюлаза	β -глюкозидаза	Протеаза	Казеиназа	Ксиланаза	Нитрат-редуктаза	Уреаза
<i>Morchella angusticeps</i>	+	+	++	+	-	-	+	+
<i>M. conica</i>	+++	++	+++	++	+++	+	+++	++
<i>M. crassipes</i>	+	+	+	++	++	+	++	+
<i>M. elata</i>	+	+	+	+	-	-	+	++
<i>M. esculenta</i>	++	++	+++	++	++	+	+++	+++
<i>M. semilibera</i>	+	+	+++	+	-	-	+	+
<i>M. spongiosa</i>	+	+	+	++	+	+	++	+
<i>M. steppicola</i>	+	++	++	++	++	+	++	++

Примечания. «-» – Реакция отсутствует; «+» – слабая реакция; «++» – средняя реакция; «+++» – сильная реакция.

В результате проведенных сравнительных исследований на агаризованных питательных средах получены новые сведения относительно культурально-морфологических и физиологических особенностей 8 видов рода *Morchella*. Рассчитана радиальная скорость роста для всех исследованных штаммов на питательных средах разного состава и показано, что наибольшие значения этого показателя были у *M. esculenta*, *M. conica* 1737 ($V_R = 18$ мм/сут). По этой характеристике они не уступают высшим базидиомицетам, отнесенным к группе быстрорастущих грибов. Все другие исследованные виды росли медленнее – в пределах 2–8 мм/сут. Для каждого вида определены питательные среды, стимулирующие формирование

склероциев: для *M. conica*, *M. elata*, *M. semilibera* – СА и ЧА; для *M. esculenta*, *M. spongiola*, *M. crassipes* – ВМДА и ЧА.

Полученные результаты сравнительного исследования выявили разницу морфологических признаков мицелиальных колоний (высота, плотность колоний, образования склероциев, окраски реверзума) на агаризованных средах различного состава. У всех исследованных видов мицелий растет при 4–26 °С, Наибольшая скорость радиального роста наблюдается при 26 °С. С помощью качественных цветных реакций исследовано наличие 11 ферментов в культурах исследованных видов, которые достаточно полно характеризуют метаболизм липидов, азотных и углеродных соединений и окислительно-восстановительные процессы. На основе полученных данных можно заключить, что весь комплекс названных характеристик (скорость радиального роста вегетативного мицелия, отношение к температурному фактору, наличие определенных ферментов) можно использовать для идентификации исследованных видов в культуре.

РОСТ И БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУР НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Актуальным направлением современных микологических и биотехнологических исследований остается создание высокоинтенсивных производств, направленных на получение грибного мицелия и метаболитов съедобных, лекарственных макромицетов на основе их глубинного культивирования. Это открывает перспективу практического использования как продуцентов пищевой биомассы видов ценных, съедобных макромицетов, которые из-за своих биолого-экологических особенностей не образуют плодовые тела в искусственных условиях. Выращивание мицелия видов рода *Morchella* в искусственных условиях требует всестороннего изучения их отношения к факторам внешней среды, которые регулируют накопление биомассы или желательных продуктов метаболизма. Изучение питательных потребностей позволило установить физиологические особенности определенных штаммов, а также использовать полученные результаты в дальнейшей работе по глубинному культивированию.

Рост мицелия при разных значениях кислотности питательных сред

Одним из важнейших и постоянно действующих физико-химических факторов, регулирующих рост и метаболизм грибов в культуре, является концентрация водородных ионов (рН) питательной среды. В связи с этим необходимо установить те пределы кислотности среды, в которых происходит активный рост исследуемых штаммов.

Показатель рН, обеспечивающий рост культур представителей рода *Morchella*, определяли на синтетической среде с глюкозой.

Установлено, что кислотность среды регулирует рост мицелия. Все исследованные виды грибов начинали расти при рН среды не ниже 4,0. Рост культур *M. semilibera* начинался при значении рН 4,5. Установлено, что рН среды в процессе роста культур снижается до значения 3,6–3,9, а у штаммов *M. esculenta* 1750, 1805, *M. semilibera* – до 4,0–4,5 (табл. 6). Рост мицелия исследованных культур наблюдали при рН 4,0–7,2. Наиболее благоприятным для активного роста всех исследованных видов был рН 5,5–6,5 (см. табл. 6). При этих значениях рН у видов *M. conica* и *M. esculenta* выход биомассы составлял более 5 г/л на 14-е сут культивирования в стационарных условиях. Культуры *M. angusticeps* и *M. semilibera*, которые характеризовались очень медленным ростом на агаризованных питательных средах, накапливали незначительное количество биомассы (не более $2,3 \pm 0,3$ г/л) на жидких средах. При рН среды выше 7,5 культуры этих видов практически не росли.

По данным литературы, представители рода *Morchella* в природных условиях способны расти и формировать плодовые тела на почвах с широким диапазоном показателя кислотности: рН 4,3–5,6 (Faris et al., 1996), рН 6,9–7,2 (Kaul, 1997). Дж. Лишфельдом с соавт. (Litchfield, 1967) для культур *M. crassipes*, *M. esculenta*, *M. hortensis* был установлен диапазон оптимальных значений рН для роста вегетативного мицелия в пределах 5,5–6,5. При исследовании физиологии *M. elata* на жидких питательных средах границы оптимального рН зависели от состава последних и варьировали в диапазоне рН 7,0–7,8 (Winder, 2006).

Таблица 6. Рост культур исследованных видов при разных значениях pH питательной среды

Вид	Штамм	Рост мицелия в диапазоне pH	Максимальный рост		
			Начальное pH	Сух. м. мицелия, г/л	Конечное pH
<i>Morchella angusticeps</i>	1833	4,0-7,2	6,0	2,3±0,3	4,6
<i>M. conica</i>	1737	4,0-7,2	6,5	4,7±0,4	3,8
	1738	4,0-7,2	6,5	3,3±0,3	3,9
	1739	4,0-7,2	6,5	2,6±0,2	3,8
	1835	4,0-7,2	6,5	2,4±0,4	3,7
<i>M. crassipes</i>	1834	4,0-7,2	6,5	3,4±0,4	3,9
	1851	4,0-7,2	6,5	3,2±0,3	3,8
	1852	4,0-7,2	6,5	2,8±0,3	3,8
<i>M. elata</i>	1891	4,0-7,2	6,5	1,9±0,3	3,7
<i>M. esculenta</i>	1744	4,0-7,2	6,5	4,2±0,1	3,8
	1746	4,0-7,2	6,5	5,6±0,2	3,8
	1747	4,0-7,2	6,0	3,5±0,3	3,9
	1748	4,0-7,2	6,0	3,7±0,2	3,7
	1749	4,0-7,2	5,5	3,4±0,3	4,0
	1750	4,0-7,2	6,5	5,6±0,1	4,2
	1753	4,0-7,2	6,0	4,1±0,4	3,6
	1755	4,0-7,2	6,5	5,5±0,1	3,8
	1805	4,0-7,2	6,5	3,5±0,3	4,4
	1820	4,0-7,2	6,5	3,9±0,3	3,7
	1843	4,0-7,2	5,5	5,2±0,1	3,9
	1844	4,0-7,2	5,5	4,8±0,2	3,7
<i>M. semilibera</i>	1740	4,5-7,2	6,0	1,1±0,2	4,4
	1846	4,5-7,2	6,0	1,7±0,2	4,6
<i>M. spongiola</i>	1837	4,0-7,2	5,5	2,9±0,4	3,8
	1838	4,0-7,2	6,0	2,6±0,2	3,9
	1850	4,0-7,2	6,0	3,4±0,2	4,1
<i>M. steppicola</i>	1849	4,0-7,2	5,5	4,5±0,4	3,8

Полученные нами данные о влиянии pH среды на рост вегетативного мицелия исследованных культур совпадают с данными литературы. Тот факт, что все исследованные штаммы активно растут при pH 5,5–6,5 позволяет проводить первичный отбор штаммов при данном значении pH. Оптимальная кислотность среды для роста активно растущих штаммов позднее устанавливалась на определенной питательной среде для их культивирования.

Рост исследованных культур на питательных средах с разными источниками углерода

Углеродсодержащие субстраты играют ведущую роль в питании грибов, обеспечивая грибной организм углеродом, необходимым для синтеза веществ живой клетки и участия в процессах окисления, где он является единственным источником энергии (Беккер, 1988). Мы исследовали влияние разных источников углеродного питания на рост 26 штаммов 8 видов рода *Morchella*. В качестве единственного источника углерода на синтетической среде нами испытаны: моносахариды – глюкоза, ксилоза; дисахариды – сахароза, лактоза; трисахарид – рафиноза; полисахарид – крахмал. Контролем служила питательная среда с глюкозой.

Исследованная группа штаммов разного географического происхождения показала высокую степень физиологической однородности в потреблении углеводов. Интенсивность роста исследованных культур отличалась на питательных средах с разными источниками углерода. Однако для всех исследованных видов лучшими источниками углерода были глюкоза и крахмал (табл. 7).

Большинство культур отдавало предпочтение глюкозе, а штаммы *M. conica* 1738 и 1739 и *M. esculenta*, 1746, 1820 и 1843 накапливали наибольшую массу мицелия (до 4,8 г/л) на питательных средах с крахмалом.

Лактоза была хорошим источником углерода только для *M. crassipes* и *M. conica*, однако масса мицелия (до 4,6 г/л) не превышала таковую на питательных средах с крахмалом и глюкозой. Исследованные штаммы *Morchella semilibera* не усваивали лактозу. Все культуры хуже усваивали сахарозу и рафинозу по сравнению с глюкозой и крахмалом.

Таблица 7. Рост исследованных культур на синтетической питательной среде с разными источниками углерода

Вид	Штамм	Масса мицелия, г/л					
		Глюкоза	Ксилоза	Сахароза	Лактоза	Рафиноза	Крахмал
<i>Morchella angusticeps</i>	1833	2,3±0,5	–	1,8±0,3	0,9±0,3	1,7±0,2	2,1±0,4
<i>M. conica</i>	1737	4,7±0,3	2,05±0,2	2,6±0,3	4,0±0,2	2,5±0,2	4,4±0,4
	1738	3,3±0,2	2,1±0,3	2,4±0,2	3,1±0,4	2,2±0,3	3,5±0,2
	1739	4,6±0,1	2,5±0,3	2,7±0,2	4,2±0,2	2,6±0,3	4,9±0,2
	1835	4,5±0,3	1,8±0,4	1,5±0,2	2,8±0,5	2,1±0,2	4,8±0,3
<i>M. crassipes</i>	1834	4,4±0,4	0,92±0,2	3,1±0,4	4,6±0,2	3,2±0,4	4,3±0,2
	1851	3,2±0,4	1,2±0,2	2,9±0,3	3,9±0,4	3,0±0,3	4,1±0,5
	1852	3,8±0,2	1,5±0,4	2,5±0,5	3,2±0,2	2,8±0,2	3,9±0,4
<i>M. elata</i>	1891	2,5±0,2	–	1,9±0,2	1,2±0,2	1,7±0,2	2,8±0,2
<i>M. esculenta</i>	1744	4,2±0,2	1,7±0,4	2,7±0,3	1,6±0,2	3,1±0,2	4,0±0,4
	1746	5,0±0,3	2,3±0,3	3,3±0,2	1,9±0,4	2,8±0,3	5,8±0,5
	1747	3,5±0,5	1,9±0,4	2,5±0,5	1,1±0,2	2,2±0,3	3,2±0,5
	1748	3,7±0,4	1,2±0,3	1,9±0,2	2,1±0,3	2,3±0,2	3,0±0,1

<i>Morchella esculenta</i>	1749	3,4±0,3	1,4±0,4	2,5±0,4	2,0±0,3	2,6±0,2	2,8±0,3
	1750	5,2±0,1	2,6±0,5	3,7±0,3	1,8±0,2	3,1±0,3	4,8±0,4
	1753	4,8±0,4	2,4±0,2	3,2±0,5	2,1±0,3	2,7±0,4	4,6±0,2
	1755	5,6±0,4	1,5±0,3	3,1±0,2	2,5±0,2	3,3±0,3	5,0±0,4
	1805	3,7±0,4	2,2±0,2	1,7±0,3	1,0±0,4	2,8±0,2	3,1±0,2
	1820	3,9±0,3	1,8±0,6	2,8±0,2	1,3±0,4	3,2±0,2	4,3±0,2
	1843	4,2±0,2	2,2±0,4	2,7±0,2	2,4±0,3	3,1±0,2	4,5±0,3
	1844	4,9±0,3	2,5±0,2	2,1±0,4	1,7±0,2	1,9±0,4	4,2±0,6
<i>M. semilibera</i>	1740	1,2±0,3	–	0,9±0,2	–	1,2±0,2	1,5±0,4
	1846	1,7±0,4	–	0,7±0,3	–	1,1±0,2	1,4±0,3
<i>M. spongiosa</i>	1837	2,9±0,2	0,78±0,4	1,4±0,3	1,1±0,5	1,6±0,2	2,6±0,3
	1838	2,6±0,4	0,55±0,5	0,7±0,2	0,9±0,2	1,1±0,3	2,2±0,5
	1850	3,5±0,2	0,67±0,2	1,2±0,5	0,6±0,4	1,4±0,2	2,9±0,2
<i>M. steppicola</i>	1849	4,5±0,2	1,2±0,3	2,4±0,4	2,0±0,2	2,7±0,4	4,0±0,3

П р и м е ч а н и я . Здесь и в табл. 5.3 жирным шрифтом отмечена статистически достоверная максимальная масса мицелия, г/л; “–” – рост мицелия отсутствовал.

Исследованные штаммы потребляли ксилозу очень слабо, а такие виды, как *M. angusticeps*, *M. elata*, *M. semiibera* вообще не использовали этот углевод. Во время роста культур на средах с разными источниками углеродного питания pH изменялось в кислую сторону.

Снижение pH среды в основном зависело от природы источника углерода и скорости его использования. На питательных средах с более медленным потреблением источника углерода, например крахмалом, pH снижалось в процессе роста культур в меньшей степени (pH 4,0–4,8), чем на средах с глюкозой (pH 3,7–4,5). По данным литературы (Gilbert, Robinson, 1957; Gilbert, 1961; Litchfield et al., 1963; Litchfield, 1967; Kaul, 1997), культуры *M. crassipes*, *M. esculenta* хорошо потребляют глюкозу, мальтозу, лактозу и крахмал.

Полученные нами результаты совпадают с данными относительно потребления этими видами глюкозы и крахмала. Однако в условиях нашего эксперимента культуры плохо усваивали лактозу в сравнении с другими источниками углерода. Хорошими источниками углеродного питания для *M. elata* считаются питательные среды, содержащие сахарозу, маннозу и лактозу, а лучший рост для этого вида обеспечивала питательная среда, содержавшая смесь сахарозы и маннозы в соотношении 1:1 (Winder, 2006). По результатам исследований О.В. Кутковой и М.М. Сухомлин (Куткова, Сухомлин, 2007), наилучшими источниками углерода при культивировании *M. steppicola* на жидкой среде является сахароза и мальтоза. По результатам наших исследований, для *M. steppicola* и *M. elata* наилучшие источники углерода – глюкоза и крахмал.

Таким образом, полученные нами результаты в основном согласуются с литературными сведениями о потребностях исследуемой группы грибов в источниках углеродного питания: лучший рост наблюдался на глюкозе и крахмале, ксилозу и лактозу культуры усваивали слабо.

Рост культур на питательных средах с разными источниками азота

Выбор источника азота очень важен для получения хорошего роста мицелия в культуре и высокого содержания в нем протеина. Общеизвестно, что грибы могут использовать

как органические, так и неорганические формы азота. По мнению ряда исследователей (Brock, 1951; Reusser et al., 1958; Litchfield, 1967), некоторые виды рода *Morchella* хорошо используют органические формы азота, в частности пептон, аспарагин. Кроме того, хороший мицелиальный рост обеспечивали и неорганические источники азота, например диаммоний фосфат.

В качестве источника азота на синтетической среде с глюкозой, испытаны нитратные (NaNO_3) и аммонийные $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ соли, а также органические соединения азота (аспарагин и пептон). Контролем служил рост мицелия на среде с NaNO_3 .

Наилучший рост у всех испытанных штаммов отмечен на средах с органическими формами азота – аспарагином и пептоном. На них культуры накапливали до 5,5 г/л биомассы на 14-е сут культивирования. Наиболее продуктивными были штаммы *M. esculenta* 1750, 1746, 1755 и 1844 и *M. conica* 1737, 1739. Хотя все исследованные культуры усваивали как аммонийный, так и нитратный азот, однако, как правило, предпочитали аммонийную форму азота (табл. 8).

Рост видов *Morchella* в глубинной культуре

Исследования по оптимизации условий глубинного культивирования отдельных представителей рода *Morchella* проводились еще в 60-х гг. XX ст. Полученные данные доказали целесообразность использования некоторых видов этого рода в качестве продуцентов мицелиальной массы пищевого назначения, а культивирование глубинным способом на жидких питательных средах – одним из возможных путей их практического использования (Brock, 1951; Reusser et al., 1958; Litchfield, 1967; Robbins, Hervey, 1959, 1965).

По результатам первичного скрининга были отобраны штаммы *M. conica* 1737 и 1739, *M. esculenta* 1755, 1750, которые активно накапливали мицелиальную массу на жидких питательных средах в стационарных условиях и могут быть перспективными для дальнейшего изучения. Следующим этапом нашей работы было исследование физиологических особенностей роста отобранных штаммов в условиях глубинного культивирования.

Таблица 8. Рост исследованных культур на жидких питательных средах с разными источниками азота

Вид	Штамм	Сухая масса мицелия, г/л			
		(NH ₄) ₂ HPO ₄	NaNO ₃	Пептон	Аспарагин
<i>Morchella angusticeps</i>	1833	2,3±0,2	1,5±0,3	2,9±0,3	2,5±0,2
<i>M. conica</i>	1737	4,7±0,3	2,2±0,4	4,2±0,2	4,6±0,5
	1738	3,3±0,2	2,9±0,3	3,5±0,4	3,7±0,4
	1739	2,6±0,1	2,0±0,2	3,0±0,3	2,8±0,2
	1835	4,5±0,3	1,8±0,2	2,9±0,4	1,9±0,5
<i>M. crassipes</i>	1834	3,4±0,4	2,1±0,4	3,5±0,5	3,3±0,3
	1851	3,2±0,4	1,9±0,3	3,8±0,2	3,5±0,4
	1852	3,0±0,2	1,5±0,3	3,7±0,5	3,3±0,3
<i>M. elata</i>	1891	2,5±0,2	1,1±0,3	2,7±0,4	2,4±0,5
<i>M. esculenta</i>	1744	4,2±0,2	2,9±0,3	4,0±0,2	3,6±0,2
	1746	5,6±0,3	3,45±0,2	5,5±0,5	5,4±0,2
	1747	3,5±0,5	2,8±0,3	3,8±0,2	4,1±0,4
	1748	3,7±0,4	3,5±0,4	3,9±0,4	4,3±0,3
	1749	3,4±0,3	2,3±0,2	3,6±0,3	3,2±0,2
	1750	5,2±0,1	4,1±0,3	5,8±0,3	5,3±0,4
	1753	4,1±0,4	3,2±0,3	4,5±0,2	4,2±0,2
	1755	5,5±0,4	3,5±0,2	4,8±0,3	4,4±0,3
	1805	3,5±0,4	2,0±0,3	2,4±0,2	4,0±0,3
	1820	3,9±0,3	2,9±0,2	3,3±0,2	3,5±0,5
	1843	4,2±0,2	2,5±0,4	4,7±0,3	3,8±0,2
	1844	4,9±0,3	3,3±0,2	4,5±0,2	4,7±0,6
<i>M. semilibera</i>	1740	1,1±0,5	0,9±0,4	1,3±0,2	1,4±0,5
	1846	1,2±0,3	1,1±0,2	1,9±0,3	1,7±0,2
<i>M. spongiosa</i>	1837	2,7±0,3	2,3±0,2	3,1±0,3	3,3±0,6
	1838	2,9±0,4	2,8±0,3	3,4±0,2	3,8±0,5
	1850	3,4±0,2	2,0±0,2	3,3±0,4	2,8±0,3
<i>M. steppicola</i>	1849	4,5±0,2	3,5±0,4	4,7±0,5	4,3±0,3

Проведена сравнительная характеристика динамики роста культур *M. conica* 1737, 1739 и *M. esculenta* 1755, 1750 на пяти питательных средах разного состава.

Использованы как синтетические, так и комплексные среды, которые, по данным литературы, являются наиболее благоприятными для мицелиального роста макромицетов. Контролем служила синтетическая питательная среда Д, предложенная Дж. Лишфельдом (Litchfield, 1967) для культивирования видов *M. esculenta*, *M. crassipes*, *M. hortensis*. Оценку роста отобранных штаммов проводили по массе сухого мицелия (г/л), полученного при ферментации.

При исследовании динамики роста культур мы установили, что лаг-фаза роста штаммов *M. conica* 1737, *M. esculenta* 1755 на всех испытанных питательных средах приходится на 1-е сут культивирования. Для культур *M. conica* 1739 и *M. esculenta* 1750 стадия адаптации на средах ГПД и С продолжалась дольше, поэтому лаг-фаза на этих средах длилась 2 сут, на ПС, синтетической среде Д и НРК лаг-фаза – 1 сутки.

После лаг-фазы скорость накопления мицелиальной массы значительно увеличивалась, что характерно для фазы активного роста (рис. 2).

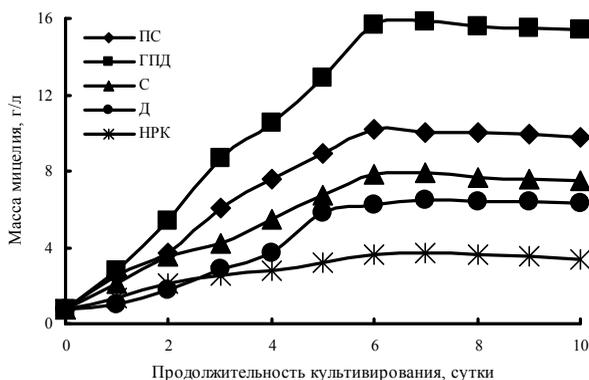


Рис. 2. Накопление мицелиальной массы *Morchella conica* 1737 в глубинной культуре на жидких питательных средах разного состава

Максимальное количество массы мицелия образовывалось при культивировании на ГПД и ПС на 6-7-е сут, на других питательных средах максимум приходился на 7-8-е сут культивирования (см. рис. 2). После фазы активного роста, которая длилась 5-6 сут, в зависимости от штамма и состава среды увеличение массы мицелия продолжалось, но со значительно меньшей скоростью, что, возможно, связано с ухудшением кислородного обмена. Для *M. conica* 1737, *M. esculenta* 1755 стационарная фаза длилась 2 сут, а для *M. conica* 1739, *M. esculenta* 1750 – 3, после чего активный рост прекращался, и количество биомассы постепенно снижалось в результате процесса автолиза.

Анализ динамики роста исследованных штаммов на питательной среде ГПД, которая содержала 25 г/л глюкозы и органические формы азота (пептон, дрожжевой экстракт), показал, что она является наилучшей для роста мицелия всех испытанных культур. Наибольшую массу мицелия в условиях эксперимента (до $15,8 \pm 0,3$ и $14,3 \pm 0,4$ г/л) продуцировали культуры *M. conica* 1737 и *M. esculenta* 1755 соответственно на 6-е сут культивирования. Культуры *M. esculenta* 1750 и *M. conica* 1739 росли медленнее, а масса мицелия составляла $10,3 \pm 0,2$ и $9,5 \pm 0,3$ г/л на 7-8-е сут культивирования (см. рис. 2, 5). В процессе роста культур активная кислотность питательной среды ГПД изменялась постепенно до pH 5,3–5,0 при начальном значении pH 6,5.

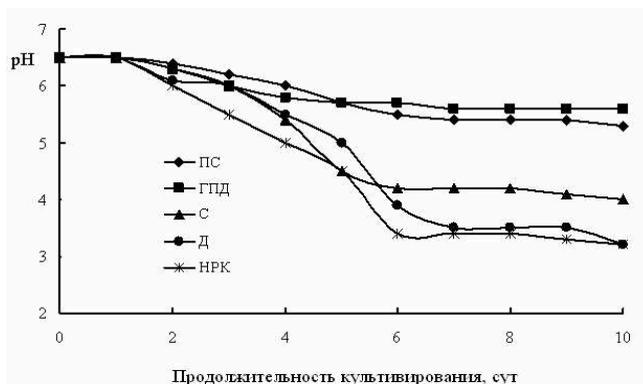


Рис. 3. Динамика pH питательных сред разного состава во время глубинного культивирования *Morchella conica* 1737

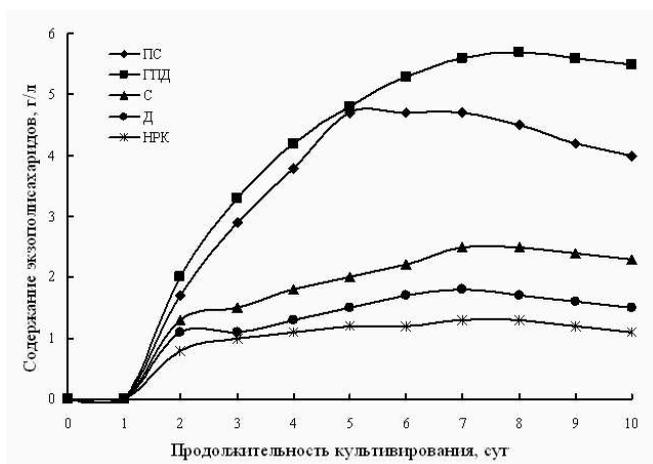


Рис. 4. Образование экзополисахаридов в глубинной культуре *Morchella conica* 1737 на жидких питательных средах разного состава

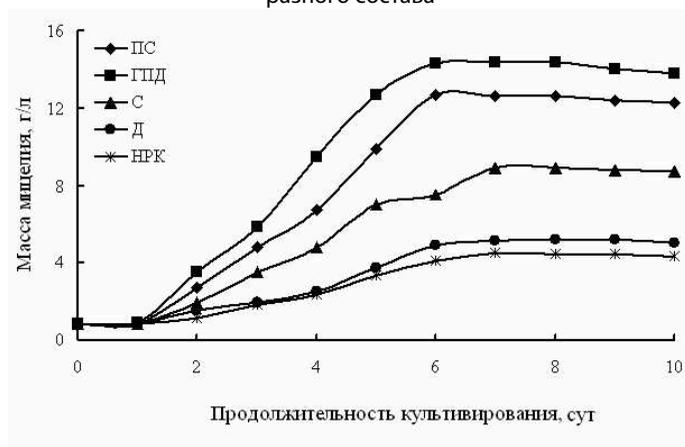


Рис. 5. Накопление мицелиальной массы *Morchella esculenta* 1755 в глубинной культуре на питательных средах разного состава

Комплексная питательная среда ПС оказалась благоприятной для роста всех исследованных культур и обеспечивала высокий выход массы мицелия. Более активными

были штаммы *M. conica* 1737 и *M. esculenta* 1755, которые на 6-е сутки культивирования продуцировали свыше 10,5 г/л культурального мицелия (см. рис. 2, 5). В период роста культур pH среды изменялся незначительно, что можно объяснить его высокой буферной емкостью по сравнению с синтетическими питательными средами Д и НРК (см. рис. 4, 6).

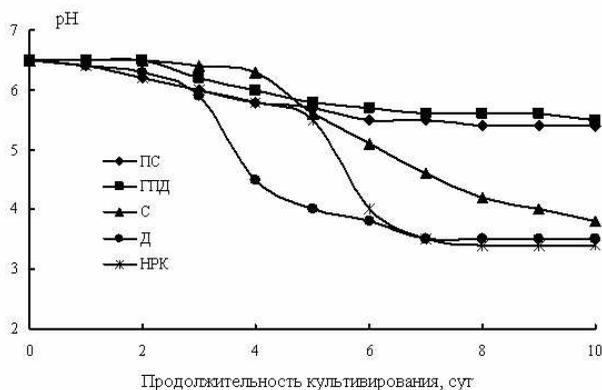


Рис. 6. Динамика pH питательных сред разного состава во время глубинного культивирования *Morchella esculenta* 1755

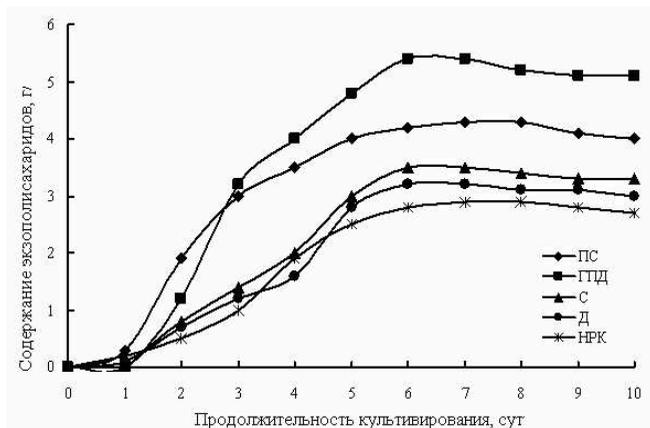


Рис. 7. Образование экзополисахаридов *Morchella esculenta* 1755 в глубинной культуре на питательных средах разного состава

На средах Д и НРК культуры росли медленно, накопление мицелиальной массы даже у самых активных штаммов (*M. conica* 1737 и *M. esculenta* 1755) не превышало $6,2 \pm 0,2$ г/л и $4,1 \pm 0,3$ г/л соответственно (см. рис. 2, 5).

Таким образом, в результате анализа динамики роста культур мы установили, что одним из факторов, ограничивающих скорость накопления мицелиальной массы на средах С, Д и НРК, является рН среды, который в процессе культивирования снижался до 4,0–3,4, что ингибировало рост культур (см. рис. 3, 6).

Исследование содержания в культуральной жидкости сухих и редуцирующих веществ показало, что на всех испытанных питательных средах, кроме ГПД, наблюдали постепенное уменьшение их содержания, минимальная концентрация сухих и редуцирующих веществ приходилась на 10-е сут культивирования. На ГПД первые 3 сут было характерным увеличение количества редуцирующих веществ, что объясняется разложением компонентов среды в несколько этапов при потреблении грибом, вследствие чего временно повышалось содержание редуцирующих веществ.

Анализ динамики накопления экзополисахаридов показывает, что на протяжении всего процесса культивирования содержание экзополисахаридов постепенно увеличивалось. Для сред ГПД, С, Д и НРК было характерным увеличение количества экзополисахаридов до 6-х сут культивирования, после чего их количество уменьшалось. Наиболее активными продуцентами оказались *M. conica* 1737 и *M. esculenta* 1755. Максимальное количество экзополисахаридов для *M. conica* 1737 составляло $5,5 \pm 0,3$ г/л на среде ГПД, наименьшее – $1,8 \pm 0,3$ и $1,3 \pm 0,4$ г/л при культивировании на средах Д и НРК соответственно (см. рис. 6). Штаммы *M. conica* 1739 и *M. esculenta* 1750 характеризовались незначительной продукцией экзополисахаридов на всех испытанных питательных средах.

Для наиболее полной характеристики роста штаммов был рассчитан экономический коэффициент (Y) и продуктивность (табл. 9).

Одним из важных признаков, по которому ведется отбор продуцентов, является продуктивность, т.е. количество образующейся в процессе культивирования массы мицелия.

Таблица 9. Основные показатели роста мицелия *Morchella conica* и *M. esculenta* в глубинной культуре на средах разного состава

Вид	Штамм	Среда	Продуктивность, г/(л-сут)	Экономический коэффициент Υ	Масса мицелия, г/л
<i>Morchella conica</i>	1737	ПС	1,6	0,70	10,5 ± 0,4
		ГПД	2,6	0,75	15,8 ± 0,3
		С	1,2	0,58	7,8 ± 0,2
		Д	0,9	0,43	6,2 ± 0,2
		НРК	0,5	0,35	3,6 ± 0,3
<i>M. conica</i>	1739	ПС	1,5	0,60	8,9 ± 0,2
		ГПД	1,5	0,70	9,5 ± 0,3
		С	1,1	0,54	7,5 ± 0,4
		Д	0,56	0,40	4,8 ± 0,3
		НРК	0,42	0,37	3,6 ± 0,3
<i>M. esculenta</i>	1755	ПС	2,6	0,72	12,7 ± 0,3
		ГПД	2,9	0,80	14,3 ± 0,4
		С	1,4	0,54	8,9 ± 0,3
		Д	0,7	0,48	5,1 ± 0,3
		НРК	0,3	0,39	4,1 ± 0,2
<i>M. esculenta</i>	1750	ПС	1,9	0,69	9,7 ± 0,3
		ГПД	1,9	0,73	10,3 ± 0,2
		С	1,5	0,55	7,9 ± 0,2
		Д	0,75	0,42	5,1 ± 0,4
		НРК	0,5	0,40	4,0 ± 0,4

Для глубинного культивирования мицелия видов рода *Morchella* некоторые авторы (Sugihara, Humfeld, 1954; Litchfield et al., 1963; Litchfield, 1967) использовали питательные среды с крахмалом и кукурузным экстрактом. В литературе есть сведения об успешном использовании комплексной среды С и синтетической Д, на которых урожай сухого мицелия *Morchella esculenta*, *M. crassipes*, *M. hortensis* в глубинной культуре составлял 40–45 г на 100 г использованной глюкозы. При глубинном культивировании *M. esculenta* и *M. conica* на предложенных питательных средах в условиях нашего эксперимента концентрация мицелиальной массы самого

продуктивного штамма *M. conica* 1737 не превышала $6,5 \pm 0,3$ г/г абсолютно сухой массы на 7-е сут культивирования (см. рис. 2).

Однако продуктивность штамма не является самостоятельным показателем. Она связана с общей эффективностью процесса культивирования. Важным показателем оценки продуктивности штамма является экономический коэффициент (Y), который характеризует способность культуры использовать для роста источники питания, и в первую очередь углерод. По данным литературы на средах Д и С для видов *M. esculenta*, *M. crassipes*, *M. hortensis* Y составлял 45–50 %. В условиях нашего эксперимента на этих средах он колебался в пределах 48–54%, а на ПС и ГПД достигал 75% (см. табл. 9). Это можно объяснить тем, что органические соединения азота, которые содержатся в этих средах, являются источником дополнительного не учтенного углерода.

В условиях нашего эксперимента культуры *Morchella conica* и *M. esculenta* росли в виде гладких и плотных, неправильной формы колоний на всех исследованных средах. Однако у каждого вида наблюдали различия в размере и окраске мицелиальных колоний. Так, для *M. conica* характерным было формирование светло-серых гладких, блестящих конгломератов неправильной формы диам. 2–5 мм, культуральная жидкость приобретала светло-желтый оттенок. У *M. esculenta* формировались темно-коричневые мицелиальные колонии неправильной формы диам. 4–8 мм, культуральная жидкость приобретала темно-янтарный цвет.

В литературе описан рост *M. esculenta*, *M. crassipes* и *M. hortensis* при глубинном культивировании, который происходил в виде плотных мицелиальных “шариков” более-менее правильной формы, а также в виде гиф (Litchfield, 1967). В первых работах по глубинному культивированию высказывалось мнение (Robinson, Davidson, 1959), что для получения пищевой биомассы при отборе перспективных штаммов предпочтение должно отдаваться тем, которые растут в форме плотных шариков, а не дисперсно, в виде отдельных гиф. Как показано в более поздних исследованиях, в глубинной культуре в зависимости от условий культивирования у одного и того же штамма могут быть разные формы роста (Соломко, Шашек, 1984; Бухало, 1988). Поэтому форма роста мицелиальной колонии как

варьирующий признак не должна быть существенным показателем при отборе продуцента на начальных этапах.

С первых шагов глубинного культивирования съедобных макромицетов при отборе штаммов решающее значение имело наличие грибного аромата в культуральной мицелии (Dijkstra, 1976; Eddy, 1958). Установлено, что вещества, которые придают грибной аромат плодовым телам и культуральной мицелию, идентичны, хотя их количественное содержание может отличаться (Dijkstra, 1976). Авторами (Brock, 1951; Dijkstra, 1976; Litchfield, 1967) установлено влияние компонентного состава питательных сред и условий культивирования на образование ароматических веществ в глубинном мицелии. Доказано, что образование грибного аромата во время глубинного культивирования происходит интенсивнее на комплексных питательных средах, которые содержат овощные экстракты, дрожжевой экстракт, мальц-экстракт.

В условиях эксперимента грибной аромат мицелиальной массы *Morchella conica* и *M. esculenta* мы определяли органолептически. Установлено, что для *M. esculenta* было характерным наличие более стойкого аромата, чем у *M. conica*. И хотя наличие грибного аромата в культуральной мицелии было отмечено на всех использованных средах, более интенсивный аромат был у мицелия, выращенного на средах с органическим азотом (ГПД и СА).

Таким образом, полученные результаты сравнительного исследования динамики роста и продукции экзополисахаридов для штаммов *M. conica* 1737, 1739 и *M. esculenta* 1750, 1755 показали, что в качестве питательных сред для глубинного культивирования отобранных штаммов *M. conica* 1737 и *M. esculenta* 1755 могут быть рекомендованы питательная среда ГПД с глюкозой и органическим азотом и пивное сусло (ПС).

На среде ГПД была наработана мицелиальная масса *Morchella conica* 1737 и *M. esculenta* 1755 и определен ее общий химический состав (табл. 10).

В ряде работ (Crisan, Sands, 1978) наиболее полные сведения о составе и питательной ценности плодовых тел дикорастущих видов приведены только для *M. conica*, *M. esculenta*. К сожалению, аналогичные данные для культурального мицелия данных видов отсутствуют. Исследование химического состава плодовых тел и культурального мицелия грибов показали, что

на содержание белковых веществ, липидов и зольных элементов кроме видовой принадлежности значительно влияет состав субстратов, условия выращивания, возраст культуры и т.п. (Соломко, Дудка, 1985; Бухало, 1988; Соломко, 1992).

Таблица 10. Общий химический состав глубинного мицелия и плодовых тел *Morchella conica* и *M. esculenta* (% абс. сух. массы)

Вид	Штамм	Сырой протеин N×4,38	Липиды	Углеводы	Зола
<i>M. conica</i>	1737	30,6	3,5	55,4	10,5
<i>M. esculenta</i>	1755	32,2	2,5	55,7	9,6
Плодовые тела <i>M. conica</i> *		21,8	5,7	60,1	7,0
Плодовые тела <i>M. esculenta</i> *		23,4	7,5	55,5	13,6

* – Данные приведены по Crisan, Sands, 1978.

В культуральном мицелии исследованных штаммов *M. conica* 1737, *M. esculenta* 1755 содержание сырого протеина составляло 30–32% (см. табл. 10). По данным литературы (Crisan, Sands, 1978), в плодовых телах сморчка конического и сморчка съедобного этот показатель не превышает 23%, что значительно меньше, чем в мицелиальной массе, полученной нами при глубинном культивировании на питательной среде ГПД.

Одним из основных компонентов грибной клетки является общий жир, содержание которого в культуральном мицелии исследованных штаммов значительно меньше, чем в плодовых телах. В тоже время, культуральный мицелий характеризуется высоким содержанием углеводов в сравнении с природными плодовыми телами.

Анализ химического состава полученной нами мицелиальной массы позволяет считать отобранные штаммы перспективными для их биотехнологического применения.

Таким образом, в результате проведенных сравнительных исследований 30 штаммов 8 видов рода *Morchella* получены новые сведения о физиологических свойствах культур на

комплексных и синтетических питательных средах. Для всех штаммов определены благоприятные для роста мицелия значения рН среды. Максимальная продукция массы мицелия выявлена в диапазоне рН 5,5–6,5. При изучении питательных потребностей выявлена их специфичность по отношению к источникам питания. Установлено, что наиболее благоприятными для роста мицелия источниками углерода являются глюкоза и крахмал, азота – пептон и аспарагин. Отобраны штаммы, активно накапливающие биомассу.

На основе данных о питательных потребностях отдельных активнорастущих штаммов проведен отбор на жидких питательных средах в условиях глубинного культивирования. Наиболее благоприятными для глубинного культивирования оказались комплексные питательные среды ГПД и ПС, которые обеспечивали продукцию мицелиальной массы до 17 г/л и экзополисахаридов более 4,5 г/л на 7-е сут культивирования в условиях эксперимента. Отобраны штаммы *Morchella conica* 1737 и *M. esculenta* 1755, которые по комплексу свойств можно считать перспективными продуцентами мицелиальной массы. Они обладают хорошей продуктивностью (до 2,9 г/(л·сут), мицелиальная масса имеет стойкий приятный грибной аромат, содержание сырого протеина – до 32%. Штаммы имеют характерные морфологические признаки, которые позволяют осуществлять постоянный микологический контроль за чистотой культуры.

Список литературы

- Беккер З.Э.** Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. – 230 с.
- Белякова Г.А., Дьяков Ю.Т., Тарасов К.Л.** Водоросли и грибы. – М.: Академия, 2006. – 320 с.
- Билай В.И.** Основы общей микологии. – Киев: Вища шк., 1989. – 392 с.
- Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П.** Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. – Киев: Наук. думка, 1983. – 312 с.
- Бухало А.С.** Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.

- Бухало А.С., Митропольская Н.Ю., Михайлова О.Б.** Каталог колекції культур шапинкових грибів ІВК. – К.: НВК „Славутич-дельфін”, 2006. – 36 с.
- Вассер С. П.** Съедобные и ядовитые грибы Карпат. – Ужгород: Карпаты, 1990. – 204 с.
- Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Трутнева И.А.** Ферментные системы высших базидиомицетов. – Киев: Наук. думка, 1989. – 280 с.
- Денисова Н.П.** Лечебные свойства грибов: Этномикологический очерк. – СПб.: Изд-во СПб ГМУ, 1998. – 59 с.
- Дзигун Л.П.** Культуральні особливості дереворуйнівного гриба *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (Basidiomycota) // Укр. бот. журн. – 2005. – **62**, № 1. – С. 91–99.
- Жизнь растений** / Ред. М. В. Горленко. – М.: Просвещение, 1976. – Т. 2. – 479 с.
- Захарова И.Я., Косенко Л.В.** Методы изучения микробных полисахаридов. – Киев: Наук. думка, 1982. – 192 с.
- Зерова М.Я.** Новый зморшок із цілинного степу (*Morchella steppicola* Zerova sp. nov.) // Бот. журн. АН УРСР. – 1941. – **2**, № 1. – С. 155-159.
- Зерова М.Я.** Атлас грибів України. – К.: Наук. думка, 1974. – 251 с.
- Куткова О.В., Сухомлин М.М.** Умови проростання аскоспор *Morchella steppicola* та *M. conica* // Мат. міжнар. конф. мол. учених-ботаніків “Актуальні проблеми ботаніки, екології та біотехнології” (Київ, 27–30 вер., 2006 р.). – К.: Фітосоціоцентр, 2006. – С. 152-153.
- Куткова О.В., Сухомлин М.Н.** Влияние различных источников углерода на рост *Morchella steppicola* // Усп. мед. микол. – М.: Нац. акад. микологии, 2007. – Т. 9. – С. 245–246.
- Ломберг М.Л.** Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2005. – 20 с.
- Методы** экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
- Мир растений** / Ред. А. П. Тахтаджян. – М.: Просвещение, 1991. – Т. 2. – 479 с.
- Михайлова О.Б., Бухало А.С.** Культурально-морфологічні особливості представників *Morchellaceae* (Ascomycetes) на агаризованих живильних середовищах // Укр. бот. журн. – 2005. – **62**, № 4. – С. 500-508.
- Михайлова О.Б., Бухало А.С.** Фізіологічні особливості представників *Morchellaceae* (Ascomycetes) в чистій культурі // Там же. – 2006. – **65**, № 5. – С. 365-372.

- Перт С.Д.** Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 332 с.
- Сміцька М.Ф., Смик Л.В., Славна Н.М.** Культуральні особливості деяких оперкулятних дискоміцетів // Там же. – 1978. – **35**, № 1. – С. 39-41.
- Смицкая М.Ф.** Флора грибов Украины. Оперкулятные дискомицеты. – Киев: Наук. думка, 1980. – 224 с.
- Соломко Э.Ф.** Синтетическая среда для культивирования *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. – Киев, 1992. – 22 с. – (Препринт / НАН Украины. Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного, 1992).
- Соломко Э.Ф., Дудка И.А.** Перспективы использования высших базидиомицетов в микробиологической промышленности. Обзор. информ. – М.: ВНИИСЭНТИ, 1985. – 48 с.
- Соломко Е.Ф., Шашек В.** Удосконалення методики вивчення фізіології та кінетики росту *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. у глибинній культурі // Укр. бот. журн. – 1984. – **41**, № 4. – С. 82-85.
- Соломко Э.Ф., Митропольская Н.Ю.** Получение посевного материала *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. глубинным методом // Микол. и фитопатол. – 1994. – **28**, № 3. – С. 34-39.
- Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю.** Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на живильних середовищах різного складу // Укр. бот. журн. – 2000. – **57**, № 2. – С. 119-126.
- Хочачка П., Семеро Дж.** Стратегия биохимической адаптации. – М: Мир, 1977. – 398 с.
- Червона** книга України. Вони чекають на нашу допомогу / Упоряд. О.Ю. Шапаренко, С.О. Шапаренко. – Харків: Торсінг, 2009. – 336 с.
- Amir R., Levanov D., Hadar Y.** Formation of sclerotia by *Morchella esculenta*: relationship between media composition and turgor potential in mycelium // Mycol. Res. – 1992. – **96**, N 11. – P. 943-948.
- Amir R., Levanov D., Hadar Y.** Morphology and physiology of *Morchella esculenta* during sclerotial formation // Ibid. – 1993. – **97**, N 6. – P. 683-689.
- Amir R., Levanov D., Hadar Y.** The role of sourcesink relationships in translocation during sclerotial formation by *Morchella esculenta* // Ibid. – 1994. – **98**, N 12. – P. 1409-1414.
- Amir R., Levanov D., Hadar Y.** Factors affecting translocation and sclerotial formation in *Morchella esculenta* // Experim. Mycology. – 1995. – **19**. – P. 61-70.
- Amir R., Steudle E., Levanov D.** Turgor changes in *Morchella esculenta* during translocation and sclerotial formation // Ibid. – 1995. – **19**. – P. 129-136.

- Apfelbaum S.I., Haney A., Dole R.F.** Ascocarp formation by *Morchella angusticeps* after wildfire // Michigan Botanist. – 1984. – **23**, N 3. – P. 99-102.
- Arora D.** Migrant mushrooms: Tales of adventure, nature love, and money on the global local mushroom trail. Whole Earth (Spring) // Ibid. – 2005. – **42**, N 1. – P. 29-38.
- Barseghyan G.S., Wasser S.P., Nevo E.** Medicinal operculate discomycetes of Israeli mycobiota // Intern. J. Med. Mushr. – 2007. – **9**, N 3-4. – P. 278-279.
- Brock T.D.** Studies on the nutrition of *Morchella esculenta* Fries // Mycologia. – 1951. – **43**. – P. 402-422.
- Buscot F.** Field observation on growth and development of *Morchella rotunda* and *Mitrophora semilibera* in relation to forest soil temperature // Can. J. Bot. – 1989. – **67**. – P. 589-593.
- Buscot F.** Mycorrhizal succession and morel biology. Mycorrhizal in ecosystems. – Wallingford, Oxon, United Kindom: CAB Intern., 1992a. – P. 220-224.
- Buscot F.** Synthesis of two types of association between *Morchella esculenta* and *Picea abies* under controlled culture conditions // J. Plant Physiol. – 1992b. – **141**. – P. 12-17.
- Buscot F.** Mycelial differentiatin of *Morchella esculenta* in pure culture // Mycol. Res. – 1993. – **97**, N 2. – P. 136-140.
- Buscot F.** Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr.) Boudier with *Picea abies* (L.) Karst. // Mycorrhiza. – 1994. – **4**. – P. 223-232.
- Buscot F., Bernillon J.** Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*// Mycol. Res. – 1991. – **95**, N 6. – P. 752-754.
- Buscot F., Kottke I.** The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. // New Phytol. – 1990. – **116**. – P. 425-430.
- Buscot F., Roux J.** Association between living roots and ascocarps of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier // Trans. Brit. Mycol. Soc. – 1987. – **89**, N 2. – P. 249-252.
- Chang S.T., Hayes W.A.** The biology and cultivation of edible mushroom. – New York: Acad. Press, 1978. – 819 p.
- Crisan E.V., Sands A.** Nutritional value // Eds. by S.T. Chang, W.A. Hayes. – New York: Acad. Press, 1978. – P. 137-168.
- Dahlstrom J., Smith J., Weber N.** Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the Pinaceae in pure culture synthesis // Mycorrhiza. – 2000. – **9**, N 3. – P. 279-285.

- Dai Yu-Ch., Yang Zh-L., Cui B-K., Yu Ch-J.** Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (Review) // Intern. J. Med. Mushr. – 2009. – **11**, N 3. – P. 287-302.
- DaSilva E.J.** Mushrooms in medicine and culture // Ibid. – 2005. – **7**. – P. 75-78.
- Delmas J.** Potential cultivation of various edible fungi // The biology and cultivation of edible mushrooms / Eds. by S.T. Chang, W.A Hayes. – New York: Acad. Press, 1978. – P. 699-724.
- Dijkstra F.Y.** Submerged cultures of mushrooms mycelium as sources of protein and flavour compounds / Dijkstra F.Y. – Delft: Delft Univ. Technol., 1976. – 106 p.
- Duncan J.G., Cibula W., Ross S.** Survey of Southeast North American and Growing Macromycetes (Higher Basidiomycetes and Ascomycetes) sporophores for Biological Activity// Intern. J. Med. Mushr. – 2003. – **5**. – P. 169-178.
- Duncan J.G., Pugh N., Pasco D.S., Ross S.A.** Isolation of a Galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *M. esculenta* // J. Agricult. Food Chem. – 2002. – **50**, N 6. – P. 5683-5685.
- Eddy B.** Production of mushroom mycelium by submerged culture // J. Sci. Food Agric. – 1958. – **9**, N 10. – P. 644-649.
- Elmastas M.I., Turkekel L.O., Gulein O.** Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *M. esculenta*) from North Turkey // Comb. Chem. & High Throug. Screen. – 2006. – **9**, N 6. – P. 443-448.
- Eyal J., Mabud M.A., Walter J.F.** Production of indigotin in submerged culture using *Morchella* nov. ES-1 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1991. – **30**. – P. 303-312.
- Faris H., Broderick A., Nair N.G.** Occurrence and initial observations of “*Morchella*” in Australia // Mushroom Biology and Mushroom Products. P. 393–399 in: Proceed. of the Second Intern. Conf. – Pennsylvania: State Univ., 1996.
- Gessner R.V.** Genetics and systematics of North American populations of *Morchella* // Can. J. Bot. – 1995. – **73**, N 1. – P. 967-972.
- Gessner R.V., Romano M.A., Schultz R.W.** Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta* // Mycol. – 1987. – **79**, N 5. – P. 683–687.
- Gilbert F.A.** The submerged culture of *Morchella* // Mycologia. – 1961. – **52**, N 2. – P. 201-209.
- Gilbert F.A., Robbinson R.F.** Food from fungi // Econom. Bot. – 1957. – **11**, N 2. – P. 126–145.

- Guzman G., Tapia F.** The known morels in Mexico: A description of a new blushing species, *Morchella rufobrunneae* and new data on *M. guatemalensis* // Mycologia. – 1998. – **90**. – P. 705-714.
- Guzman G., Torres M.F., Logermann H.** Fungi from Guatemala. New species of *Morchella* // Mycol. Helv. – 1985. – N 1. – P. 451-459.
- Hamid A., Shah F.H., Qadeer M.A.** Production of mushroom mycelium from industrial waster // Pakistan J. Biochem. – 1972. – N 5. – P. 57-60.
- Hervey A., Bistis G., Leong I.** Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta* // Mycologia. – 1978. – **70**, N 6. – P. 1269-1273.
- Hobbs Ch.** Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture. – Santa Cruz: Bot. Press, 1996. – 251 p.
- Humfeld H., Sugihara T.F.** Mushroom mycelium production by submerged propagation // Food Technol. – 1949. – **3**, N 10. – P. 335-356.
- Humfeld H.** Production of mushroom mycelium // Year Book U.S. Dep. Agr. – New York, 1951. – 242 p.
- Jacobs M.E.** Beta-alanine and tanning polymorphisms // Comparat. Biochem Physiol. – 1982. – **72**, N 2. – P. 173-177.
- Janardhanan K.K., Kaul T.N., Husan A.** Use of vegetable wastes for the production of fungal protein from *Morchella* species // J. Food Sci. Technol. – 1970. – **35**, N 7. – P. 197-199.
- Mau J.-L., Chang Ch.-N., Huang Sh.-J.** Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia // Food Chem. – 2004. – **87**. – P. 111-118.
- Kaul T.N.** Recent developments in morel biology / Eds. by R.D. Rai, B.L. Dhar, R.N. Verma // Advances in mushroom biology and production. – MSI Solan, 1997. – P. 59-81.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A.** Ainsworth & Bisby's. Dictionary of the Fungi. 10th ed. – Wallingford; Oxon, United Kingdom: CABI Publ., 2008. – 771 p.
- Kuo M.** Morels. – Michigan: Univ. of Michigan Press, 2005. – 205 p.
- Leonard T.J., T. Volk.** Production of specialty mushrooms in North America: shiitake and morels. – New York: Frontiers in Industrial Mycology, 1992. – P. 1-23.
- Levanov A.R., Hadar D.Y., Chet I.** Formation of sclerotia by *Morchella esculenta*: relationship between media composition and turgor potential in the mycelium // Mycologia. – 1992. – **96**. – P. 943-948.
- Li Q.P.** The cultivation on medicinal fungi. – Beijing: Chinese Agric. Press, 2006. – 188 p.

- Li H., Bao H.Y., Li Y.** Advances of researches on the *Morchella* // J. Fungal Res. – 2002. – N 2. – P. 53-56.
- Litchfield J.H., Overbeck R.C., Davidson A.** Factors affecting the growth of *Morchella* mushroom mycelium in submerged culture // J. Agricult. Food Chem. – 1963. – 11, N 2. – P. 158-162.
- Litchfield J.H.** Submerged culture of mushroom mycelium // Microbial Technol. – 1967. – P. 327-337.
- Masaphy S.** Effect of CaCO₃ on *Morchella* growth and sclerotia formation // Science and Cultivation Edible and Medicinal Fungi. – 2004. – P. 111-117.
- McIlvaine C., Macadam R.K.** One thousand American fungi. – New York: Dover Publ. INC, 1973. – 729 p.
- Miller S.L., Orson K.J.** Mushrooms of North America. – New York: E.P. Dutton, 1980. – 368 p.
- Molitoris H.P.** Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi // Czech Mycol. – 2000. – 52, N 2. – P. 97-24.
- Molitoris H.P., Schaumann K.** Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi // The biology of marine fungi. – Cambridge: Univ. Press, 1989. – P. 35-37.
- Nitha B., Meera C.R., Janardhan K.K.** Anti-inflammatory and antitumor activities of cultured mycelium of the morel mushroom, *Morchella esculenta* (L.) Pers. // Intern. J. Med. Mushr. – 2007. – 9, N 3-4. – P. 349.
- Nobles M.K.** Cultural characters as a guide to the taxonomy of Polyporaceae // International Symposium Evolution in Higher Basidiomycetes / Eds. by R. Peterson. – Knoxville: Univ. Tenn. Press, 1971. – P. 169-192.
- Ower R.** Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta* // Mycologia. – 1982. – 74, N 1. – P. 142-144.
- Ower R.D., Mills G.L., Malachowski J.A.** Pat. 4594809 США, A01G ¼. Cultivation of *Morchella* / – № 728176; 29.04.85. - 27.09.86, НКИ 47/1.1. – 15 c.
- Ower R.D., Mills G.L., Malachowski J.A.** Pat. 4757640 США, A01G 04. Cultivation of *Morchella* / – № 872823. - 11.06.86. - 27.09.88, НКИ 47/1.1. – 21 c.
- Ower R.D., Mills G.L., Malachowski J.A.** Pat. 4866878 США, A01G 04. Cultivation of *Morchella* / – № 217840. - 12.07.88. - 19.09.89, НКИ 47/1.1. – 22 c.
- Pilz D., McLain R., Alexander S.** Ecology and management of morels harvested from the forests of Western North America. – New York: USDA, 2007. – 161 p.

- Prasad P., Chauhan K., Kandari L.** *Morchella esculenta* (Guchhi): need for scientific intervention for its cultivation in Central Himalaya // *Curr. Sci.* – 2002. – **82**, – N 9-10. – P. 1098-1100.
- Reusser F., Spencer J.F., Sallans H.R.** Protein and fat content of some mushrooms grown in submerged culture // *Appl. Microbiol.* – 1958. – **6**, N 1. – P. 1-11.
- Robbins W.J., Hervey A.** Wood extract and growth of *Morchella* // *Mycologia.* – 1959. – **51**, N 3. – P. 356-363.
- Robbins W.J., Hervey A.** Manganese, calcium and filtrate factor for *Morchella crassipes* // *Mycologia.* – 1965. – **57**, N 2. – P. 262-275.
- Robinson R.F., Davidson R.S.** The large-scale growth of higher fungi // *Adv. Appl. Microbiol.* – 1959. – N 1. – P. 261-278.
- Rotzoll N., Dunkel A., Hofmann T.** Activity-guided identification of (S)-molic acid 1-0-D glucopyranoside (morelid) and gamma-aminobutyric acid as contributors to umami taste and mouth-drying oral sensation of morel mushrooms // *J. Agricult. Food Chem.* – 2005. – **53**, N 10. – P. 4149-4156.
- Rowe R.F.** The commercial harvesting of wild edible mushrooms in the Pasific Northwest region of the United States // *Mycologist.* – 1997. – **11**, N 1. – P. 10-15.
- Singer R., Harris B.** *Mushrooms and Truffles: Botany, Cultivation and Utilization.* – Koenigstein: Koeltz Sci. Books, 1987. – 389 p.
- Singh S.K., Verma R.N.** Effect of nutrients on mycelial growth and sclerotia formation // *Sci. Cult. Edible Fungi.* – 2000. – **2**. – P. 531-534.
- Solak M.H., Yilmazersel F., Kalmis E., Kalyoncu F.** Morphological and anatomical characterization of *Morchella eximia*. Recorded for the first time in Turkey // *Mushr. Biology and Mushr. Products.* – 2004. – **12**. – P. 145-151.
- Stalpers J.A.** Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture // *Stud. Mycol.* – 1978. – N 16. – P. 5-248.
- Stamets P.** *Growing gourmet and medicinal mushrooms.* – Hong Kong: Ten Speed Press, 2000. – 574 p.
- Stanikunaite R., Trappe J.M., Khan S.I., Ross S.A.** Evaluation of therapeutic activity of hypogeous Ascomycetes and Basidiomycetes from North America // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2007. – **9**, N 1. – P. 7-14.
- Stott K., Mohammed C.** *Specialty mushroom production systems: Maitake and Morels.* – Sydney: RIRDC Publ., 2004. – 86 p.
- Sugihara T.F., Humfeld H.** Submerged culture of the mycelium of various species of mushrooms // *Appl. Microbiol.* – 1954. – **2**, N 1. – P. 170-172.

- Sutton J.C., Sheppard B.R.** Aggregation of sandy-dune soil by ectomycorrhizal fungi // *Can. J. Bot.* – 1976. – **54**. – P. 326-333.
- Tura D., Zmitrovich I.V., Wasser S.P., Nevo E.** Medicinal species from genera *Inonotus* and *Phellinus* (Aphyllorphomycetidae): cultural-morphological peculiarities, growth characteristics, and qualitative enzymatic activity tests // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2009. – **11**, N 3. – P. 309-328.
- Turkoglu A., Kivrak I., Mercan N.** Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. // *Afr. J. Biotechnol.* – 2006. – **5**, N 11. – P. 1146-1150.
- Volk T.J., Leonard T.** Experimental studies on the morel. 1. Heterokaryon formation between monoasporous strains of *Morchella* // *Mycologia*. – 1989. – **81**, N 4. – P. 523-531.
- Volk T.J., Leonard T.** Cytology of the life cycle of *Morchella* // *Mycol. Res.* – 1990. – **94**, N 3. – P. 399-406.
- Winder R.** Cultural studies of *Morchella elata* Fr. // *Ibid.* – 2006. – **110**, N 2. – P. 612-623.
- Yang Q.Y., Jong S.C.** Medicinal mushrooms in China // *Mushr. Sci.* – 1989. – **12**. – 644 p.
- Ying J.-H., Mao X., Ma Q.** *Icones of medicinal fungi from China*. Translated by X. Yuehan. – Beijing: Sci. Press, 1987. – 575 p.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ СЪЕДОБНЫХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ

В.Г. Бабицкая¹, В.В. Щерба¹, Т.А. Пучкова¹, Н.А. Бисько²

¹Ин-т микробиологии НАН Беларуси,
ул. Купревича, 2, 220141 Минск, Республика Беларусь

²Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, 01001 Киев, Украина

Радиоактивное загрязнение, наличие ксенобиотиков, тяжелых металлов, ядохимикатов, нитратов в пищевых продуктах и кормах сельскохозяйственных животных наряду с несбалансированным питанием отрицательно влияют на состояние здоровья населения, являются причиной хронических, аллергических, онкологических и других заболеваний. Неблагоприятное влияние факторов внешней среды можно уменьшить за счет ограничения попадания в организм вредных веществ путем регламентирования и запрещения их поступления в среду обитания человека, а также путем увеличения резистентности организма за счет повышения неспецифической устойчивости, расширения иммунной системы, усиления восстановительных процессов, в т.ч. касающихся целостности генетических структур. В поисках лечебных и лечебно-профилактических средств все большее внимание исследователей привлекают лекарственные грибы, обладающие антиоксидантными свойствами и содержащие биологически активные вещества.

Установлено, что грибы в условиях глубинного культивирования синтезируют широкий спектр биологически активных соединений: каротиноиды, низко- и высокомолекулярные фенольные соединения, полисахариды, углеводные протекторы, белки, липиды и др., причем в количествах, превышающих таковые в плодовых телах. Доказано, что синтез многих компонентов глубинного мицелия, так же как и его сорбционную активность, можно регулировать путем изменения условий культивирования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования и питательные среды

Объектами исследования были штаммы видов, относящиеся к родам *Lentinus*, *Ganoderma*, *Crinipellis*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Laetiporus*, *Phellinus*, *Inonotus*, полученные из коллекций Ин-та микробиологии НАН Беларуси (Минск), Ин-та леса НАН Беларуси (Гомель) и Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины (Киев) (IBK).

Грибы поддерживали на сусло-агаровой среде (4° Б), хранили при 4 °С.

В работе использовали следующие питательные среды:

- а) пивное сусло (8° Б), сусло-агар;
- б) среду с молочной сывороткой: молочная депротеинизированная сыворотка – 2%; меласса – 1%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5%; дрожжевой или кукурузный экстракт – 0,1%, вода – 1 л;
- в) среду с молочной сывороткой без мелассы;
- г) полусинтетическую глюкозо-пептонную среду, г/л: глюкоза – 30, пептон – 3, KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, кукурузный экстракт – 20 мл, вода – 1 л.
- д) синтетическую среду Сонга (Song et al., 1987).

Штаммы выращивали на вышеперечисленных средах в колбах Эрленмейера на качалке (180 об/мин) и в лабораторных ферментерах АК-10 при температуре 20-30 °С в течение 5-10 сут. В состав подобранных производственных сред для культивирования во ферментере входили: для *Ganoderma lucidum* – молочная сыворотка (5%) и подсолнечный шрот (0,7%); для *Laetiporus sulphureus* – ржаная мука (3%) и крахмал (1%). Температура культивирования составляла 25-27 °С.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Удельную скорость роста, способность к синтезу биологически активных веществ определяли при выращивании отобранных штаммов на глюкозо-пептонной среде и пивном сусле (Низковская, 1972; Методы ..., 1977).

Отношение отобранного штамма к источникам углерода, минеральным и органическим источникам азота изучали на

глюкозо-пептонной среде, оптимальные значения pH и температуры – на оптимизированной среде. Источники углерода в глюкозо-пептонную среду добавляли эквивалентно 10 г/л глюкозы. При определении отношения штаммов к источникам азота использовали глюкозо-пептонную питательную среду, содержащую 10 г/л глюкозы, источник азота добавляли эквивалентно количеству азота в 2 г NaNO_3 (Бухало, 1988). Для изучения влияния аэрации штаммы выращивали в колбах объемом 500 мл с 50, 100, 150, 200, 250 и 300 мл среды, что позволяло создавать скорости растворения кислорода в среде от 0,55 до 0,115 г/л·ч (Егоров, 1976). Влияние температуры определяли при 15, 20, 25, 30 °С.

После выращивания мицелий грибов отделяли через нейлоновую ткань, многократно промывали водой, высушивали при 60 °С, измельчали и использовали для проведения химических анализов.

Содержание общего азота ($N_{\text{общ}}$) в мицелии и плодовых телах определяли по Кьельдалю (Ермаков, 1987), содержание сырого протеина рассчитывали как $N_{\text{общ}} \times 6,25$, белок определяли по Лоури (Lowry et al., 1951), фракции белков – по Ермакову (1987), суммарное количество нуклеиновых кислот – по Спирину (1958), аминокислотный состав белков исследовали на анализаторе аминокислот «AAA-881» («Microtechna», Чехия).

Липиды экстрагировали методом Фолча (Folch et al., 1957), жирнокислотный состав липидов анализировали в виде метиловых эфиров жирных кислот на газожидкостном хроматографе «Chrom-5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 3,7 м, заполненную хроматоном N-AW с 15% полиэтиленгликоль-сукцинатом в изотермическом режиме при температуре испарителя 210 °С и температуре колонки 160 °С. Идентификацию жирных кислот проводили по относительным объемам удерживания, а также в сопоставлении с показателями контрольных метиловых эфиров жирных кислот (Верещагин и др., 1963; Кейтс, 1975). Степень ненасыщенности липидов (СН) рассчитывали по формуле (Феофилова и др., 1998):

1 (% моноены) + 2 (% диены) + 3 (% триены)

100

Содержание фосфолипидов (ФЛ) в липидах определяли после их сжигания (0,25 мг) в 42%-й хлорной кислоте с последующим добавлением 1,25% молибдата аммония и 5% аскорбиновой кислоты. Реакция идет при кипячении в течение 5 мин. Экстинкцию окрашенных растворов измеряли спектрофотометрически на СФ-26 при длине волны 897 нм и по калибровке определяли концентрацию неорганического фосфора (P) в образце, массовую долю ФЛ рассчитывали по формуле (Феофилова и др., 1999):

$$\text{ФЛ} = P \times K,$$

где P – количество фосфора, мкг, $K = 22,6$ – коэффициент пересчета на органическое вещество.

Отделение полярных липидов от нейтральных осуществляли методом осаждения холодным ацетоном (Кейтс, 1975). Для этого аликвотную часть липидов (100-200 мг) помещали в центрифужную пробирку емкостью 10 мл. Раствор упаривали в токе азота при 30 °С до 0,2-0,3 мл, добавляли 5 мл ацетона и 0,1 мл 10%-го раствора $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ в метаноле, перемешивали и охлаждали в бане со льдом в течение 1 ч. Суспензию центрифугировали 3-5 мин при 2500 об/мин и удаляли супернатант пастеровской пипеткой. Осадок промывали, суспендируя в 1 мл холодного ацетона, суспензию охлаждали в бане со льдом и центрифугировали. Промывание повторяли 2-3 раза. Отмытый осадок (фракция полярных липидов) перерастворяли в хлороформе. Ацетоновый супернатант (фракция нейтральных липидов) объединяли. Весовое соотношение фракций определяли после их высушивания гравиметрическим методом.

Для разделения смеси липидов использовали хроматографию на колонке с силикагелем L-100/400 «LACHEMA», высушенным при 120 °С. Высота слоя адсорбента в колонке 10 см, диаметр колонки 0,8 см. Однородную суспензию силикагеля

в хлороформе переносили в хроматографическую колонку и дважды промывали 10 мл хлороформа. Совместив уровень растворителя с верхней границей адсорбента, по стенкам колонки добавляли 150-200 мг общих липидов в 5 мл хлороформа. При скорости элюирования 3 мл/мин колонку промывали следующими растворителями: 70-100 мл хлороформа (нейтральные липиды), 180-200 мл ацетона (менее полярные липиды), 150-170 мл этанола ректификата (более полярные липиды).

Разделение общих липидов проводили методом противоточного распределения между двумя несмешивающимися растворителями. Аликвотную часть общих липидов (0,5 г) растворяли в 45 мл верхней гесановой фазы, полученной при смешивании равных объемов гексана и 87%-го этанола. Раствор переносили в делительную воронку и встряхивали с 15 мл нижней этанольной фазы. Через 3-4 мин отделившуюся нижнюю фазу переносили во вторую воронку, содержащую 45 мл верхней фазы, а в первую воронку добавляли 15 мл нижней фазы. Обе воронки встряхивали и через 3-4 мин переносили нижнюю фазу из второй воронки в колбу, из первой воронки во вторую. Повторяли такое распределение 6 раз, на последней стадии распределения в первую воронку уже не добавляли нижнюю фазу. Нейтральные липиды содержались в верхней фазе, полярные – в нижней.

Разделение нейтральных липидов на отдельные составляющие компоненты проводили методом тонкослойной хроматографии, которую осуществляли на пластинах Silufol UV254 (Kavalier) в системе гексан : диэтиловый эфир : этанол = 70:30:1. Для обнаружения и идентификации индивидуальных липидов хроматограммы просматривали в УФ-свете (366 нм), а также проявляли в парах йода (Кейтс, 1975).

Разделение полярных липидов на отдельные составляющие проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silicagel (Merck Kieselgel 60F 254) в системе хлороформ : метанол : вода = 65 : 25 : 4.

Для получения экстрактов глубинного мицелия и плодовых тел их тонко измельчали, многократно замораживали в жидком азоте и исчерпывающе экстрагировали 70⁰ этиловым спиртом в течение 30 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником до отрицательной пробы на содержание

фенольных соединений. Полученный экстракт центрифугировали при 8000 g (15 мин).

Сумму моно- и полифенолов определяли с реактивом Фолина-Дениса (Запрометов, 1993; Бабицкая, Щерба, 1999).

Моноциклические фенольные соединения получали путём обработки очищенного спиртового экстракта диэтиловым эфиром. К эфирной фракции, содержащей фенолы и фенолокислоты, добавляли равное количество 2%-го раствора Na_2CO_3 . После энергичного встряхивания эфир отделяли на делительной воронке, а водный раствор подкисляли HCl и освободившиеся фенолкислоты снова переводили в эфир. Полученную эфирную фракцию фенолкарбоновых кислот сушили над Na_2SO_4 , повторно растворяли и использовали для хроматографии.

Выделение O-гетероциклических соединений из спиртового экстракта проводили с помощью гель-хроматографии на колонке (1,0×25,0 см), заполненной сефадексом G-25. Элюирующим раствором служила 0,1 М уксусная кислота. Для качественного анализа фенольных соединений применяли двумерную бумажную хроматографию (Хайс, Мацек, 1962). Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинах Silufol в различных системах (Кирхнер, 1981). Для проявления хроматограмм использовали следующие хромогенные реактивы: хлорид алюминия и железа, diazotированную сульфаниловую кислоту (ДСК), железоаммонийные квасцы, реактив Вильсона (0,5 г лимонной и 0,5 г борной кислот в 20 мл безводного метанола), уксуснокислый свинец, фосфорно-молибденовую кислоту.

Анализ эфирных фракций, содержащих фенолокислоты, проводили на хроматографе «Chrom 5» с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 1 м, заполненную хроматоном N-AW-HMDS, обработанную 1% H_3PO_4 с 3% полиэтиленгликольадипината. Условия хроматографирования: температура испарителя 280 °С, температура колонки в режиме программирования от 100 до 200 °С со скоростью 3° в мин и последующей выдержкой 12 мин при 220 °С. УФ-спектры индивидуальных соединений снимали на спектрофотометре «Specord UV VIS», ИК-спектры – на спектрофотометре UR-20.

Хитин-глюкановый комплекс определяли по методу Кюршнера и Ганека (Петербургский, 1968).

Для извлечения полисахаридов из плодовых тел и глубинного мицелия их разрушали в гомогенизаторе или растиранием в ступке при глубоком замораживании с помощью жидкого азота. Разрушенные плодовые тела или мицелий заливали дистиллированной водой в соотношении 1:10 или 1:5 соответственно весу и кипятили на водяной бане в течение 12-18 ч. Удаление цитоплазматического содержимого осуществляли многократным суспендированием разрушенного мицелия и плодовых тел в дистиллированной воде с центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин. Процедуру отмывания прекращали лишь тогда, когда оптическая плотность супернатанта при 280 нм не превышала 0,1 (Chichara et al., 1970; Гончарова и др., 1996). Полученные экстракты концентрировали 2-3 раза на роторном испарителе, обрабатывали 96° этиловым спиртом в соотношении 1:1 по объему и оставляли при температуре 4° до полного осаждения. Выпавший осадок (полисахарид) отделяли центрифугированием, затем его диализовали против дистиллированной воды в течение 3 сут. Диализированный полисахарид осаждали этиловым спиртом в соотношении 1:2, промывали этанолом, эфиром, ацетоном и сушили при 37 °С. Гомогенность полисахарида проверяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-200, обнаружение полисахарида в элюенте осуществляли с помощью фенол-серноокислотного метода (Грушенко и др., 1978).

Для извлечения экзополисахаридов культуральную жидкость упаривали 2-3 раза, осаждали этиловым спиртом (1:1), оставляли при температуре 4 °С до полного осаждения, затем осаждённые полисахариды отделяли центрифугированием, диализовали 3 сут против дистиллированной воды, пересаждали спиртом, отделяли центрифугированием и сушили при температуре 37 °С (Babitskaya et al., 2000a).

Кинетические параметры количественной оценки эффективности процессов роста базидиомицетов и биосинтеза полисахаридов рассчитывали по формулам (Юрлова, Копылова, 1993):

1. Скорость потребления источника углерода при синтезе полисахарида (Y) (г/л·ч)

$$Y = \frac{C_{n-1} - C_n}{t_n - t_{n-1}},$$

где C_n и C_{n-1} – концентрации редуцирующих веществ в среде в момент времени t_n и t_{n-1} соответственно.

2. Скорость образования полисахарида (X) (г/л·ч)

$$X = \frac{M'_n - M'_{n-1}}{t_n - t_{n-1}},$$

где M'_n и M'_{n-1} – выход полисахарида (г/л) в моменты времени t_n и t_{n-1} соответственно.

3. Удельная скорость образования полисахарида (Z) (ч⁻¹)

$$Z = \frac{M'_n - M'_{n-1}}{(M_n - M_{n-1})(t_n - t_{n-1})},$$

где M'_n и M'_{n-1} – выход полисахарида (г/л) в моменты времени t_n и t_{n-1} соответственно; M_n и M_{n-1} – выход биомассы продуцента (г/л) в моменты времени t_n и t_{n-1} соответственно.

4. Удельная скорость роста продуцента (μ) (ч⁻¹)

$$\mu = \frac{\ln M_n - \ln M'_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}$$

5. Продуктивность процесса биосинтеза полисахарида (П) (г/л·ч)

$$П = \frac{M'_n}{M_n \cdot \Delta t},$$

где Δt – промежуток времени, в течение которого измеряется продуктивность (12 ч).

6. Экономический коэффициент (ЭК) использования источника углерода на биосинтез полисахарида (%)

$$ЭК = \frac{M'_n}{C_{исх} - C_n},$$

где $C_{\text{исх}}$ и C_n – концентрация редуцирующих веществ в исходной питательной среде и в момент времени t_n соответственно.

Ионообменную хроматографию полисахаридов проводили на ДЭАЕ целлюлозе в ОН-форме, колонка 2,5×20 см. Полисахариды последовательно элюировали 80 мл дистиллированной воды, 1 М и 2 М NaCl. Содержание полисахаридов во фракциях определяли фенолсерноокислотным методом (Грушенко и др., 1978).

Гельхроматографию полисахаридов осуществляли на сефадексе G-200, колонка 1×25 см. В качестве элюента использовали фосфатный буфер pH 7,2. Объем наносимой пробы 0,5-1,0 мл. Скорость потока 3-5 мл/ч.

Молекулярную массу изучаемых полисахаридов определяли по калибровочной кривой. Кривую строили по декстранам, имеющим определенную молекулярную массу (20, 40, 70, 500 кДа («Fluka»). Свободный объем колонки устанавливали по голубому декстрану (2000 кДа, «Pharmacia»).

Кинематическую вязкость (ν) 0,1% растворов полисахаридов определяли с помощью вискозиметра ВПЖ-4 с диаметром капилляра 0,82 мм при 25 °С и рассчитывали по формуле:

$$\nu = \frac{g \cdot t \cdot k}{9,807} ,$$

где t – время истечения, k – коэффициент вискозиметра 0,0303, g – ускорение свободного падения 9,8 м/с².

Угол вращения плоскости поляризации растворами полисахаридов измеряли на поляриметре круговом ПМ-3 (Россия) при температуре 20 °С, длине волны плоскополяризованного света (λ) 589,5 нм, кювете 1 дм. Удельное вращение плоскости поляризации растворов полисахаридов $[\alpha]_D^{20}$ рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha_D^{20}}{c \cdot l} ,$$

где α_D^{20} – угол вращения; c – концентрация раствора, г/100 мл; l – толщина слоя раствора 1 дм.

Содержание белка в растворах полисахаридов определяли по Бредфорду (Bradford, 1976). ИК-спектры поглощения снимали на «Specord M-80» (Германия).

Химическую структуру фракций полисахаридов устанавливали с помощью метода периодатного окисления с последующим боргидридным восстановлением окисленных продуктов.

Окисление полисахаридов проводили в 0,015 М растворе периодата натрия при температуре 5-6 °С в течение 7 сут. Через определённые промежутки времени отбирали аликвотные пробы растворов, измеряли расход периодата и количество выделившейся муравьиной кислоты. За расходом периодата следили по уменьшению поглощения иона периодата при 223 нм (Gutierrez et al., 1996).

Количественное определение муравьиной кислоты осуществляли на хроматографе «Chrom 5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2,8 м, заполненную носителем «Separon SCN» в изотермическом режиме при температуре термостата 170 °С, испарителя 200 °С. В качестве внутреннего стандарта использовали 0,4%-й раствор пропанола.

Окисленные периодатом натрия растворы полисахаридов восстанавливали боргидридом натрия по: Gutierrez et al., 1996, затем гидролизировали в 1 н. HCl в течение 6 ч при 100 °С (мягкий гидролиз) и 0,5 н. H₂SO₄ в течение 6 ч при 100 °С (жесткий гидролиз). Гидролизаты нейтрализовали, выпаривали досуха при 45 °С, продукты гидролиза определяли методом ГЖХ в виде ТМС производных сахаров.

Абсолютную конфигурацию моносахаридов определяли по описанной в литературе методике (Gutierrez et al., 1996).

Для изучения углеводного состава мицелий растирали в ступке при замораживании в жидком азоте. Полученную гомогенную массу трижды экстрагировали 96° этиловым спиртом на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Экстракты объединяли и центрифугировали при 3000 г в течение 20 мин.

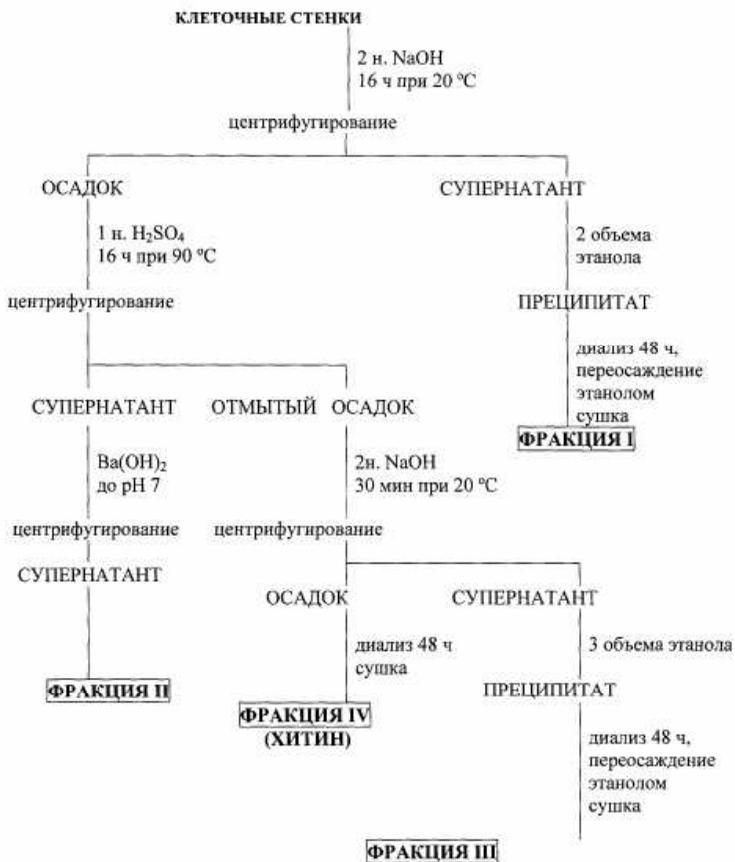


Схема получения отдельных фракций полисахаридов
клеточных стенок (Гончарова и др., 1996)

Надосадочную жидкость (спиртовая фракция) очищали на ионообменных смолах Dowex-1 (ацетатная форма) и Dowex-50W (H⁺) и использовали для определения свободных углеводов цитозоля клетки. Аналогичным образом получали водную фракцию углеводов. Полученный осадок использовали для определения структурных полисахаридов клеточной стенки. Отдельные фракции полисахаридов получали по схеме, в основу которой положен метод, описанный И.А. Гончаровой с

соавт. (1996). Ступенчатое расщепление клеточных стенок осуществляли с помощью 2 н. гидроксида натрия и 1 н. серной кислоты с последующим осаждением полисахаридов из щелочных экстрактов этиловым спиртом.

Состав углеводов спиртовой, водной и кислотной фракций, а также полисахаридов (после предварительного гидролиза) определяли методом ГЖХ в виде триметилсилильных (ТМС) производных сахаров (Бробст, 1975). Хроматографирование проводили на хроматографе «Chrom 5» с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2,8 м, заполненную хроматоном N-AW-HMDS с 5% жидкой фазы SE-30, при температуре 190 °С для ТМС-производных полиолов и углеводов, для дисахаридов – при программном повышении температуры до 190-280 °С со скоростью 5° в минуту. В качестве газа-носителя использовали гелий. Идентификацию полиолов и углеводов проводили с помощью метчиков и по величинам относительных удерживаемых объёмов ТМС-производных полиолов и углеводов. Полисахариды гидролизировали серной кислотой: 20 мг полисахарида заливали 2 мл 72%-й серной кислоты и оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Затем пробы разводили водой до 7%-й концентрации кислоты и гидролизировали на кипящей водяной бане в течение 5 ч (Елинов, 1989).

Витамины определяли по Ермакову (1987), содержание эргостерина – по методу Либермана-Бурхарда в модификации Проскуракова (Проскураков и др., 1938), содержание триглицеридов – набором для определения триглицеридов в сыровотке крови компании PLIVA LACHEMIA, Чехия.

Для определения содержания **каротиноидов** (Britton et al., 1995) навеску (500 мг) сырого мицелия растирали промытым кварцевым песком (1:1) до однородной массы.

Экстракцию каротиноидов проводили этиловым ректифицированным спиртом в несколько приемов из расчета 50 мл на 500 мг сухого мицелия. Для этого к полученной массе прибавляли порционно по 10-15 мл этилового спирта (96 °) и тщательно растирали. Полученную суспензию сливали в колбу, добавляя в нее каждый раз порцию проэкстрагированной суспензии. Всю проэкстрагированную суспензию фильтровали в колбе Вюрца (объем 100-150 мл) через стеклянный фильтр под

вакуумом. Фильтрат сливали в мерную колбу объемом 50 мл с притертой пробкой и оставляли в темном месте. Экстракцию каротиноидов осуществляли в предельно сжатые сроки, без доступа яркого света.

Полученный суммарный фильтрат доводили в мерной колбе объемом 50 мл до метки этиловым спиртом. Количество каротиноидов определяли сразу после завершения процедуры извлечения каротиноидов на спектрофотометре типа СФ-26, при длине волны 450 нм в кювете 10 мм. Контролем служил 96° этиловый спирт. При необходимости экстракт разводят этанолом (Britton et al., 1995).

Содержание каротиноидов рассчитывали по формуле:

$$X = 10 \times D \times V \times A \times 100 / E_{1\text{ см}}^{1\%} \times a,$$

где X – содержание каротиноидов, мг/100 г абсолютно сухой биомассы; 10 – содержание каротина в 1 мл 1%-го раствора, мг; D – показатель оптической плотности исследуемого раствора при 450 нм; V – общий объем экстракта, мл; A – разведение анализируемого образца, взятого из общего объема экстракта для спектрофотометрии; 100 – коэффициент пересчета на 100 г анализируемого образца; $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2500$ – экстинкция (удельный показатель поглощения 1%-го раствора каротина при 450 нм); a – навеска мицелля (г) в пересчете на абсолютно сухую биомассу.

Минеральные элементы определяли следующим образом: минерализацию образцов биомассы проводили методом сухого озоления. Остаток после озоления растворяли в азотной кислоте (1:1). Содержание металлов в растворах определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Сатурн 3П-1»: резонансная линия Ca – 422,7 нм; Mg – 282,2 нм; Fe – 248,4 нм. P определяли спектрофотометрически, Na, K – на пламенном фотометре.

Содержание металлов в исследуемых пробах рассчитывали по формуле:

$$X = V \cdot (A_1 - A_0) / m,$$

где X – массовая концентрация металла в пробе (мг/кг); A_1 – концентрация металла в исследуемом кислотном растворе золы (определяется по градуировочному графику, мкг/см³); A_0 – концентрация металла в холостой пробе (мкг/см³); V – объём

исследуемого раствора зола, см³; m – масса воздушно-сухой пробы, г.

Антиоксидантную активность (АОА) спиртовых экстрактов мицелия и плодовых тел определяли по методике Капича (Капич и др., 1991; Капич, Шишкина, 1992). Об антиокислительных свойствах глубинного мицелия грибов судили по способности экстрактов тормозить образование продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов). За 100% принимали величину АОА ионола – известного антиоксиданта.

Выделение меланинов. Экстракцию тёмно-коричневого пигмента из биомассы проводили 2%-м раствором NaOH, разбавляя 1:10, в течение 2 ч на кипящей водяной бане (Щерба и др., 1999). Полученный экстракт охлаждали, подкисляли до pH 2 концентрированной HCl и коагулировавший пигмент отделяли центрифугированием при 6000 г в течение 15 мин. Осадок растворяли в 2%-м растворе NaOH и использовали для определения выхода меланина, количество которого рассчитывали по калибровочной кривой, построенной на основании данных фотометрирования растворов пигмента различной концентрации при длине волны проходящего света 490 нм. Содержание меланина в среде культивирования определяли прямым фотометрированием культуральной жидкости после отделения мицелиальной массы грибов.

Для идентификации пигмента использовали качественные реакции с KMnO₄, H₂O₂, FeCl₃ (Лях, 1981). Функциональные группы определяли методом титрометрического анализа (Закис, 1987), спектральные измерения проводили на «Specord M-40» (Германия), ИК-спектры поглощения снимали на «Specord M-80» (Германия), спектры ЭПР – на радиоспектрометре «Varian E-112» (США), в качестве эталона использовали Mn²⁺ в порошке MnO. Элементный состав пигмента определяли волюметрически в ГНУ «Ин-т физико-органической химии НАН Беларуси». Тип меланина устанавливали с использованием методов, описанных в литературе (Бабицкая, Щерба, 2002; Piatelli, 1965). Меланины очищали методом гель-хроматографии на колонке 1,5x72 см с сорбентом Toyopearl HW-65 (Япония, Tojo Soda) в 0,01 н. NaOH (Гриффитс, 1978). Очищенные меланины с целью обессоливания диализовали против воды и лиофильно высушивали.

Определение молекулярной массы меланинов проводили хроматографически на колонке с сорбентом Toyopearl HW-65 (1,5x72 см), предварительно калиброванную белками с известной молекулярной массой: БСА – 69 кДа, цитохром С – 12,3 кДа, ПХ – 44 кДа. Скорость элюции фракций 60 мл/ч. Оптическую плотность собранных фракций измеряли на СФ-26 и «Срескорд М-40» при длине волны 460 нм. Контролем служил 0,01 М NaOH (Грифитс, 1978).

Идентифицировали меланиновые пигменты при помощи качественных реакций с KMnO_4 , H_2O_2 , дитионитом натрия и FeCl_3 . Щелочные растворы пигментов подвергали окислению 10%-ным раствором пероксида водорода и насыщенным раствором перманганата калия в течение суток. Взаимодействие меланинов с FeCl_3 проводили в условиях его недостатка и избытка (Лях, 1981).

Анализ элементного состава осуществляли согласно методике Закиса (1987). Образцы меланинов исследовали на содержание N, C, H (%).

Определение содержания **метоксильных групп** проводили по методу Цейзеля с применением газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) (Закис, 1987). Навеску меланина 20 и 5 мг 57%-й HI помещали в круглодонную колбу, снабженную эффективным обратным холодильником. Смесь кипятили в течение 15 мин, после охлаждения добавляли 10 мл воды и 10 мл CCl_4 , энергично встряхивали для экстракции CH_3I . Шприцом отделяли слой CCl_4 , сливали его в пробирку и высушивали над Na_2SO_4 . Высушенный раствор микрошприцом вводили в хроматограф. Условия хроматографирования: детектор – катарометр, газ-носитель гелий (скорость потока 25 мл/мин), колонка из нержавеющей стали (3 м x 3 мм), заполненная апиезоном L (15%) на хроматоне N, температура колонки 110 °С, испарителя – 150 °С, скорость диаграммной ленты 600 мм/ч. Для расчета содержания метоксильных групп строили калибровочный график, в качестве эталонного вещества использовали ванилин, количество метоксильных групп (%) рассчитывали по формуле.

Общее количественное содержание **гидроксильных групп** определяли хемосорбционным методом (Закис, 1987). В колбу емкостью 25 мл помещали навеску меланина 40 мг, прибавляли из микробюретки 5 мл 0,1 н. LiOH, 2 мл этанола и нагревали в течение 3 мин на водяной бане. К горячему раствору

прибавляли 1 мл 10 %-го раствора BaCl_2 , охлаждали, доводили объем до 25 мл дистиллированной водой и центрифугировали. Затем отбирали 20 мл прозрачного супернатанта и выливали в колбу с 5 мл 0,1 н. HCl , добавляли метиловый красный (0,2%-й раствор в 60%-м спирте), избыток кислоты оттитровывали 0,1 н. LiOH . В идентичных условиях, но без навески пигмента, проводили контрольный опыт. Содержание OH -групп (%) рассчитывали по формуле, по разнице объемов раствора LiOH , израсходованного на титрование в рабочем и контрольном опытах.

Содержание **алифатических гидроксильных групп** определяли методом фталирования (Закис, 1987). Для этого к навеске меланина 100 мг добавляли 5 мл фталирующей смеси (50 мл пиридина + 5 г фталевого ангидрида) и 2 мл бензола. Смесь нагревали в течение 3 ч при 80 °С, разбавляли водой и выдерживали еще 10 мин. После охлаждения фталированный пигмент отфильтровывали и оттитровывали 0,2 н. KOH в присутствии 0,1%-го фенолфталеина в 60%-ном спирте. Параллельно ставили контрольный опыт без навески меланина. Количество алифатических OH -групп (%) рассчитывали по разнице объемов раствора KOH , израсходованного на титрование в рабочем и контрольном опытах.

Для определения содержания **карбоксильных групп** к 40 мг меланина прибавляли 20 мл 0,4 н. раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$, нагревали смесь в течение 30 мин на водяной бане при 85 °С. Затем колбу охлаждали и фильтровали через сухой беззольный фильтр. Объем смеси доводили до 25 мл. Содержание карбоксильных групп определяли титрометрически: 20 мл фильтрата титровали 0,05 н. LiOH в присутствии 0,1%-го фенолфталеина в 60%-м $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Количество карбоксильных групп (%) рассчитывали по разнице объемов раствора LiOH , израсходованного на титрование в рабочем и контрольном опытах (Закис, 1987).

Содержание **карбонильных групп** в меланинах определяли методом оксимирования (Закис, 1987). В пробирку помещали 80 мг меланина, добавляли 2 мл диметилсульфоксида и 5 мл оксимирующей смеси, состоящей из 0,2 н. раствора гидрохлоридгидроксиламина и 0,08 н. раствора триэаноламина в 96%-ном спирте. Смесь нагревали в течение 2 ч при 80 °С, затем в охлажденном растворе оттитровывали

избыток триэтаноламина 0,1 н. HCl до pH 3,3. Параллельно ставили контрольную пробу. Количество карбонильных групп рассчитывали по разнице объемов раствора HCl, израсходованного на титрование в рабочем и контрольном опытах.

При оптимизации состава питательной среды исследовали влияние углерода и азота на рост грибов-продуцентов и образование меланиновых пигментов. В качестве единственного источника углеродного питания использовали моно-, дисахариды, сахароспирты (1% по углероду), полисахариды, ржаную муку, малоновую кислоту, натрий янтарно- и щавелевокислый (1% по весу). Азотсодержащие соединения (различные минеральные и органические источники) вносили в среду в концентрации 0,33 г/л, эквивалентной содержанию азота в среде (Бухало, 1988). Дополнительно вносили ионы меди в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в количестве 0,001-0,02%, ароматические предшественники меланиногенеза: фенол, пирокатехин, тирозин, нафтол, бензойная и параоксibenзойная кислота в количестве 0,02%.

Зависимость роста грибных культур и продукции меланинов от активной кислотности среды исследовали при pH 3-10. Определяли pH потенциометрически.

Устанавливали уровень накопления биомассы, выход эндо- и экзомеланинов и общий выход пигментов.

В качестве инокулята при поверхностном культивировании использовали диски грибного мицелия (радиус 2 мм), взятые с периферической части 5-суточных колоний грибов. Инкубировали в термостатных камерах при 18, 24 и 28 °C в течение 30 сут, ежедневно измеряя диаметр колоний во взаимноперпендикулярных направлениях. Степень пигментации мицелия определяли визуально.

Среднюю скорость радиального роста (K_r , мм/сут) в фазе линейного роста определяли по формуле (Бухало, 1988):

$$K_r = (a-b) / n,$$

где a – радиус колонии в конце фазы линейного роста, мм; b – радиус колонии в начале фазы линейного роста, мм; n – длительность линейного роста, сут.

Для скрининга химических соединений, подавляющих меланиногенез, грибы выращивали на оптимизированной среде

в колбах на качалке при 25-27 °С в течение 10-15 сут. Ингибиторы вносили в питательные среды в определенных концентрациях в виде стерильных растворов: ионол в концентрации 5-125 мкг/мл; рутин – 2-50 мкг/мл; аскорбиновая кислота – 10-250 мкг/мл; койевая кислота – 50-1000 мкг/мл. О подавлении биосинтеза пигментов судили визуально по исчезновению пигментации мицелия и изменению активностей ферментов, ответственных за образование меланинов (орто- и пара-дифенолоксидазы).

Активность о-дифенолоксидазы (тирозиназы) (КФ 1.14.18.1) определяли спектрофотометрическим методом на основании измерения оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении пирокатехина (тирозина) (Ермаков, 1987). При оценке активности п-ди-фенолоксидазы (лакказы) (КФ 1.10.3.2.) в качестве окисляемого субстрата использовали гидрохлорид-п-фенилендиамин (Закис, 1987). Активность выражали в ед./г сухой биомассы. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 1 мин трансформирует 1 мкмоль субстрата в указанных условиях.

Растворенный в этиловом спирте ингибитор – койевую кислоту – вносили в концентрации 1000 мкг/мл в расплавленные питательные среды в виде этанольного раствора. Контролем служили 10-14-суточные культуры грибов, выращенные на агаризованных средах без ингибитора, а также содержащих соответствующее количество этанола. О блокировании биосинтеза меланина судили по депигментации мицелия.

Для получения суммарного экстракта после выращивания грибов агар, содержащийся в чашках Петри (10 шт.) вместе с грибной биомассой, измельчали, переносили в колбы, добавляли ацетон (250 мл) и оставляли на качалке на 2-3 ч. Затем кусочки агара отделяли фильтрованием, ацетон отгоняли на роторном испарителе, а водный остаток подкисляли 1 М раствором фосфорной кислоты до рН 5 и экстрагировали дважды этилацетатом (по 100 мл). Осадок высушивали над безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняли на роторном вакуумном испарителе. Полученный сухой остаток растворяли в ацетоне и наносили на хроматографические пластины "Silufol"(15x15 см). Хроматографию проводили в следующих системах растворителей: эфир-бензол-муравьиная

кислота (50:50:1); хлороформ-ацетон (9:1) (Кирхнер, 1981). Идентификацию метаболитов осуществляли путем сравнения полученных хроматографических характеристик цветных реакций с химическими реагентами, УФ-спектроскопии с данными литературы.

Щелочное плавление меланинов проводили с использованием 6 н. КОН (Piatelli, 1965). Продукты щелочной плавки на хроматограммах идентифицировали в присутствии модельных соединений пара-оксибензойной, салициловой и протокатеховой кислот, пирокатехина, а также данных УФ-спектроскопии.

Антиоксидантные свойства меланинов исследовали на кафедре биохимии БГУ на модели метаболической активации ароматических аминов (мутагенов) по пероксидазному пути окисления. В качестве окисляемых субстратов использовали бензидин и его метилированные производные – 3,3'-диметилбензидин и 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин, представляющие вещества с убывающей канцерогенностью.

Реакцию пероксидазного окисления аминоксифенилов проводили в 0,1 М цитратно-ацетатном буфере, pH 5,5. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала 7×10^{-11} М пероксидазы хрена (ПХ; «Reanal»), 0,5 мМ субстрата, 0,1 мМ H_2O_2 . Реакционную смесь инкубировали при 30 °С. Реакцию начинали с добавления H_2O_2 . За ходом реакции следили по накоплению окрашенных продуктов, которые определяли спектрофотометрически на СФ-26 при длине волны 460 нм. За 100% принимали полное окисление аминоксифенилов за 4 мин. Концентрация меланиновых пигментов в реакционной смеси составляла 2-400 мкг/мл.

Сорбцию тяжелых металлов в модельной сорбционной системе грибным мицелием и меланином оценивали по уменьшению концентрации соответствующих ионов после контакта воздушно высушенного сорбента растворами $CuSO_4$, $NiSO_4$, $Pb(NO_3)_2$, $ZnCl_2$. Содержание ионов металлов в растворах до и после сорбции оценивали методом комплексометрического титрования 0,1 н. раствором Na_2EDTA (трилон Б) в присутствии индикаторов меди и никеля – мурексида, цинка и свинца – эриохрома черного Т (Власова, 1993). Для расчета сорбционной емкости вес навески сорбента пересчитывали на абсолютно сухую массу. Условия сорбции, за исключением случаев, когда варьировали концентрацию, кислотность и

температуру, были следующие: исходные концентрации растворов 0,25 мМ, рН 5,5, температура 24 °С.

При изучении эффективности процесса сорбции тяжелых металлов – ионов меди в зависимости от внешних условий использовали грибную биомассу и грибные меланины. Сорбционную емкость сорбента оценивали по убыли меди в растворе CuSO_4 после сорбции. Процесс проводили при комнатной температуре с постоянным перемешиванием (180-200 об/мин), соотношение сорбент-раствор составляло 1:100. Концентрацию ионов меди определяли фотокалориметрически на приборе КФК-3 при длине проходящего света 540 нм, используя в качестве реагентов трилон Б, аммиак, цитрат натрия, диэтилдитиокарбамат натрия (Власова, 1993).

Для сравнительной характеристики различных сорбентов использовали величину их сорбционной ёмкости (СОЕ) (Schiewer, Volesky, 1995):

$$S = (C_i - C_s)V/m,$$

где S – сорбционная ёмкость, мг-экв./г; C_i – концентрация исходного раствора соли, мг-экв./л; C_s – концентрация раствора соли после сорбции, мг-экв./л; V – объём пробы, л; m – масса навески сорбента, г.

Спектральные измерения (поглощение меланиновыми пигментами УФ- и видимого света) осуществляли с помощью прибора «Specord M-40» (Германия).

ИК-спектры меланинов и их Cu -форм регистрировали на спектрофотометре «Specord M-80» (Германия) в диапазоне длин волн 3800–400 см^{-1} с разрешением 0,5 см^{-1} . Образцы меланинов для получения спектров готовили в виде таблеток прессованием с KBr при нагрузке 7 атм. в течение 30 сек (Беллами, 1971).

Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре “Varian E-112” (США). Навеску анализируемого объекта ~100 мг помещали в кварцевую ампулу $d = 5$ мм, расположенную в измерительной ячейке прибора. Для повышения точности определения параметров спектров ЭПР и контроля уровня микроволновой мощности, поступающей в измерительный резонатор, спектр анализируемого объекта записывался одновременно с эталонным образцом порошка MgO с микропримесью ионов Mn^{2+} и Cr^{3+} . Интенсивность и параметры

сигналов ЭПР определяли при уровне микроволновой мощности 0,1 mW, регистрировали ЭПР-спектры меланинов при высоких уровнях микроволновой мощности (50 mW). Степень насыщенности сигнала оценивали по отношению амплитуд сигналов, полученных при 50 и 0,1 mW.

Для определения содержания тяжелых металлов в сорбирующих субстанциях пробы сжигали в муфельной печи при температуре 300 °С в течение 6 ч. Зольный остаток заливали 50%-ной азотной кислотой (15 мл), нагревали до кипения, фильтровали, доводили дистиллированной водой и анализировали на содержание ионов металлов.

При изучении влияния влажности биомассы и ее компонентов на сорбционную емкость по отношению к ионам меди данный показатель варьировал в интервале от 10 до 80% в условиях сушки при температурах +50, +20 и –10 °С.

Влияние органических и минеральных соединений на эффективность связывания меди изучали с использованием солей биогенных элементов (калий, кальций, магний), тяжелых металлов (свинец, кадмий, цинк) в концентрации 0,25 мМ, а также различных источников углерода и азота.

Анионообменные свойства грибной биомассы оценивали потенциометрическим титрованием, которое проводили методом одной навески при постоянной ионной силе 0,2 н. раствора NaCl с использованием иономера ЭВ-74 с электродами ЭСЛ 43-07 и ЭВЛ 1М3 (электрод сравнения). Титрантами служили 0,05 н. растворы NaOH и HCl.

Ионообменную емкость рассчитывали на основании кривых титрования по формулам:

$$E_k = (V_1 \cdot N_1) / n; E_n = (V_2 \cdot N_2) / n; E_A = E_n - E_k,$$

где E_k – катионообменная емкость; E_n – полная ионо-обменная емкость; E_A – анионообменная емкость; V_1 – объем титранта (NaOH) до верхнего перегиба кривой; V_2 – объем титранта (HCl) до нижнего перегиба кривой; N_1 и N_2 – нормальность титранта (0,05).

Связывание нитратов оценивали по их убыли в растворе после контакта с биомассой гриба. Метод основан на реакции нитрат-ионов с салицилатом натрия в среде концентрированной серной кислоты, в результате которой образуется смесь 3- и 5-нитросалициловых кислот, соли которых в

щелочной среде имеют желтую окраску. Оптическую плотность растворов определяли на фотоэлектрическом фотометре КФК-3 (Россия).

Связывание стронция изучали методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборе AAS-30 Carl Zeiss, Jena (Austria) с использованием 0,25 мМ концентрации стабильного изотопа стронция.

Поглощение аммиака глубинной биомассой проводили по методу, разработанному в ИПИПРЭ НАН Беларуси (Томсон и др., 2001).

Адсорбционную активность по индикатору метиленовому голубому определяли по методике ГОСТ 4453-74(88). Для измерения оптической плотности растворов использовали КФК-2МП.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета Microsoft excel (Карпушкина, 2001).

МЕЛАНИНОВЫЕ ПИГМЕНТЫ

Меланины представляют собой многочисленный и интенсивно изучаемый класс природных полифенольных пигментов, которые встречаются у живых организмов на всех эволюционных уровнях (Бабицкая и др., 1998а, б; Борщевская, Васильева, 1999; Бабицкая, 2000; Henson et al., 1999; Nosanchuk, Casadevall, 2003).

Меланины – собирательное название для группы черных и коричневых пигментов, образующихся при окислительной полимеризации фенолов, содержащих или не содержащих азот (Лях, 1981). Меланиновый пигмент представляет собой полимер относительно высокой молекулярной массы, состоящий в основном из ароматических субъединиц. Эти субъединицы соединены различными типами связей: простыми и двойными углеродными, в т.ч. сопряженными, эфирными и сложно-эфирными. Кроме ароматических структур в макромолекулах обнаруживаются линейные углеводные и аминокислотные радикалы.

Меланин – единственный известный природный полимер с сильно развитой системой полисопряжения. Многочисленные

парамагнитные центры (ПМЦ) обуславливают специфическую реакционную способность меланиновых пигментов. По всей вероятности, именно они участвуют в дезактивации свободных радикалов, возникающих после облучения организма УФ-светом или ионизирующей радиацией.

Меланины животного происхождения (эумеланины и феомеланины) являются постоянным предметом детального изучения (Барабой, 2001; Ito, 2003). В то же время черные и коричневые пигменты различных систематических групп грибов, известные как алломеланины, фактически были признаны только в начале 60-х гг. XX в. (Wheeler, 1983; Wheeler, Bell, 1987; Макордей, 1994; De Angelis, 1996). На основании исследования пигментов животного и растительного происхождения в 90-е годы XX в. была сформулирована концепция, заключающаяся в том, что природа меланинового пигмента определяется филогенетическим уровнем организма, т.е. «индольные» меланины более характерны для животных, «пирокатехиновые» чаще встречаются у растений (Лях, 1981).

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что меланинсинтезирующие грибы занимают главенствующее положение в местообитаниях с критическими условиями жизни для других живых организмов: воздействие интенсивного УФ-излучения, крайние экстремальные температуры, высокая засоленность и труднодоступность влаги, резкие перепады температуры и давления, радиоактивное загрязнение и др. (Ma et al., 2000; Zhdanova, 2000; Robinson, 2001).

Ведущая роль в устойчивости этих видов принадлежит меланинам, чья "барьерная" функция объясняется особенностями их физико-химических свойств и локализацией в поверхностных структурах мицелия на границе контакта организма с внешней средой. Барьерный принцип представляется наиболее простым, надежным и при определенной полифункциональности протектора довольно универсальным средством изоляции клеточных структур от повреждающего воздействия того или иного фактора.

Меланиновые пигменты базидиальных грибов остаются наименее изученной группой меланинов (Бабицкая и др., 2002а,б; Wasser, 2002). В настоящее время наблюдается очевид-

ный прогресс в исследовании меланинов высших базидиальных грибов, что, несомненно, связано с появлением новых подходов и методов в изучении их физико-химических и биологических свойств, в частности метода термической деструкции, используемого для идентификации и изучения структуры меланинов (Сушинская и др., 2005).

НАКОПЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ У ШТАММОВ *PHELLINUS ROBUSTUS* И *INONOTUS OBLIQUUS* ПРИ ПОВЕРХНОСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Проведенные нами опыты свидетельствуют о том, что изучаемые штаммы *Ph. robustus* и *I. obliquus* продуцируют пигменты как в поверхностной, так и в глубинной культуре. При выращивании на жидких средах в одинаковых условиях культивирования цвет биомассы грибов может варьировать от светло-бежевого до темно-коричневого. При культивировании на агаризованных питательных средах видимые различия в окраске колоний, как правило, наблюдаются только в случае изменения условий эксперимента.

Одним из факторов, влияющих на рост базидиальных грибов и образование пигментов в поверхностной культуре, является температура культивирования.

Изучение влияния температуры на рост различных штаммов *Ph. robustus*, и *I. obliquus*, а также накопление меланина в биомассе проводили на агаризованной глюкозо-пептонной среде.

Результаты исследования показали, что температура культивирования в пределах оптимума для мезофильных грибов (18-28 °С) оказывает существенное влияние не только на скорость роста мицелия исследованных отдельных штаммов *Ph. robustus* и *I. obliquus*, но и на образование меланина.

Штамм *Ph. robustus* М-10 характеризовался максимальной скоростью роста при температуре 24 °С, штаммы IBK-1551, IBK-1695 и IBK-1730, выделенные в Украине, – при 28 °С.

При наиболее благоприятных температурах для роста грибов *Ph. robustus* и *I. obliquus* были хорошо заметны их штаммовые отличия. Штамм М-10 формировал плотные,

войлочные колонии ржаво-коричневого цвета (более молодой мицелий – светло-коричневый, охристый), с хорошо выраженной зональностью; реверзум – темнопигментирован, заметны пигментные зоны, которые по мере старения культуры сливались в единое целое.

В отличие от М-10 колонии штаммов IBK-1551, IBK-1695 были более рыхлые и пушистые. Окраска колонии варьировала от светло- до темно-коричневой, зональность практически отсутствовала, реверзум темнопигментированный в виде лучей, расходящихся от центра колонии к краю, штамм IBK-1551 характеризовался слегка приподнятым центром колонии.

По внешнему виду сильно отличался от предыдущих культур штамм IBK-1730, колонии которого были слабо опушенные, вначале светло-охристого цвета с серовато-зеленоватым оттенком, затем темно-коричневые. Реверзум пигментирован по всей поверхности, окраска – интенсивно черная, однородная. При повышении температуры культивирования до 28 °С на поверхности мицелия выделялись ржаво-коричневые круговые зоны.

При температуре 28 °С колонии штаммов М-10, IBK-1551 и IBK-1695 морфологически были сходны с выросшими при 24 °С, однако характеризовались более плотным мицелием, разреженной пигментацией.

Понижение температуры до 18 °С значительно замедляло рост исследованных культур, при этом значения K_t снизились более чем в 2 раза. Наблюдались изменения пигментации и внешнего вида колоний (табл. 1). Штамм М-10, выросший при 18 °С, имел слабоопушенные колонии светло-желтого цвета, зональность практически отсутствовала, пигментация светло-коричневая, неравномерная. Колонии штаммов IBK-1551, IBK-1695 отличались более пушистым войлочным мицелием светло-желтой окраски. Пигментация светло-коричневого цвета концентрировалась в центре колонии (диаметр пигментной зоны 20-25 мм). Морфологически штамм К-1730 при 18 °С резко отличался от такового выросшего при 24 °С, характеризовался густым, войлочным, светло-желтым мицелием, отсутствием пигментации.

Максимальный выход биомассы с единицы поверхности питательной среды через 1 месяц инкубирования, когда рост и меланиногенез полностью прекратились, у штаммов IBK-1695 и

IBK-1730 наблюдался при значениях температурного максимума, у штамма IBK-1551 выход биомассы оставался практически неизменным во всех вариантах опыта (табл. 1).

Таблица 1. Влияние температуры на скорость роста (Kr) и содержание меланина в биомассе штаммов *Phellinus robustus*

Штамм	T, °C	Kr, мм /сут	Биомасса, мг / см ²	Меланин	
				% в био-массе	Выход, мг/см ²
M-10	18	1,3±0,32	7,0±0,15	6,4±0,08	0,5±0,06
	24	3,1±0,08	19,8±0,23	14,2±0,05	2,8±0,03
	28	2,3±0,05	13,0 ±0,36	12,7±0,06	1,7±0,01
IBK-1551	18	1,1±0,24	16,2±0,14	3,3±0,04	0,5±0,12
	24	2,4±0,14	16,0±0,21	9,1±0,13	1,5±0,04
	28	2,8±0,16	16,7±0,30	10,8±0,02	1,8±0,18
IBK-1695	18	1,0±0,35	10,6±0,40	2,8±0,08	0,3±0,05
	24	2,2±0,05	13,0±0,22	6,5±0,02	0,9±0,02
	28	2,3±0,04	16,0±0,27	9,0±0,12	1,4±0,03
IBK-1730	18	0,9±0,13	8,0±0,30	6,8±0,03	0,5±0,08
	24	1,8±0,02	8,6±0,10	8,9±0,14	0,8±0,04
	28	2,0±0,20	10,6±0,25	11,2±0,02	1,2±0,05

Определение содержания меланина в мицелии исследуемых культур показало, что воздействие температуры на синтез пигмента аналогично ее влиянию на скорость роста колоний. Наиболее высоким уровнем образования пигмента отличался штамм *Ph. robustus* M-10, продуцирующий его более 2,8 мг/см² (см. табл. 1).

Штаммы *Inonotus obliquus* образовывали колонии с пушистым войлочным мицелием светло-желтой окраски, которая по мере старения культуры становилась желто-коричневой. Реверзум штамма В-26, в отличие от такового В-7, был пигментирован по всей поверхности, окраска равномерная, черно-коричневая.

Повышение температуры до 28 °C негативно отражалось на росте штаммов и сопровождалось частичной утратой пигментации. При температуре 18 °C происходило значительное (~ в 3 раза) замедление роста штаммов *I. obliquus*, соответственно уменьшалось накопление меланина (табл. 2).

Таблица 2. Влияние температуры на скорость роста и содержание меланина в биомассе штаммов *Inonotus obliquus*

Штамм	T, °C	Kp, мм/сут	Биомасса, мг/см ²	Меланин	
				% в биомассе	Выход, мг/см ²
B-26	18	1.0±0,02	7,1±0,25	5,9±0,03	0,4±0,02
	24	2,8±0,06	17,7±0,36	13,8±0,02	2,5±0,05
	28	2,2±0,14	11,0±0,45	9,8±0,12	1,5±0,06
B-7	18	0,9±0,21	8,0±0,20	6,4±0,10	0,5±0,12
	24	2,4±0,30	15,2±0,31	10,3±0,04	1,4±0,14
	28	2,2±0,15	10,4±0,12	9,0±0,02	1,2±0,04

Среди штаммов *I. obliquus* наиболее продуктивным оказался *I. obliquus* B-26, образующий 2,5 мг меланина/см² поверхности и имеющий скорость роста 2,8 мм/сут. Максимальные рост штаммов *I. obliquus* и образование ими пигмента наблюдались при температуре культивирования 24 °C (см. табл. 2).

Исследование влияния глюкозы, сахарозы, лактозы, крахмала и целлюлозы в качестве источников углеродного питания на скорость роста грибов и образование меланина показало, что штаммы *Ph. robustus* M-10, IBK-1551, IBK-1695 и IBK-1730 при росте на глюкозе характеризуются высокими значениями скорости роста и стабильной пигментацией темно-коричневого и черного цвета. Наибольшей скоростью роста на всех исследованных источниках углерода и образованием темно-коричневого и черного пигмента характеризовался штамм *Ph. robustus* M-10 (табл. 3).

Физико-химические свойства меланиновых пигментов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26

Для определения принадлежности пигментов, образуемых грибами *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 при поверхностном культивировании, к меланинам применяли комплексный подход в изучении их физико-химических свойств, включающий: растворимость в типичных для этих пигментов растворителях (растворах щелочи, концентрированных H₂SO₄ и HNO₃), окисление под воздействием H₂O₂, Na₂S₂O₄, KMnO₄ и бромной воды, взаимодействие с FeCl₃; анализ элементного состава и

Таблица 3. Влияние различных источников углерода на рост и пигментацию мицелия

Источник углерода, %	Штаммы <i>Ph. robustus</i>							
	М-10		К-1551		К-1695		К-1730	
	Kr, мм/сут	Пигментация	Kr, мм/сут	Пигментация	Kr, мм/сут	Пигментация	Kr, мм/сут	Пигментация
Глюкоза	3,2±0,11	++	3,0±0,33	++	2,8±0,29	++	2,2±0,29	++
Сахароза	2,8±0,06	–	2,2±0,14	+–	2,9±0,40	–	2,3±0,03	+
Лактоза	1,8±0,25	–	1,4±0,14	+	1,2±0,35	+	1,3±0,14	–
Крахмал	3,2±0,14	++	2,3±0,25	+–	2,3±0,30	+	3,1±0,14	++
Целлюлоза	2,9±0,30	–	1,6±0,17	–	1,8±0,17	–	1,9±0,14	–

функциональных групп; регистрацию УФ-, ИК- и ЭПР-спектров поглощения; определение молекулярных масс. Данные, характеризующие растворимость и взаимодействие пигментов изучаемых грибов с рядом соединений, приведены в табл. 4.

Таблица 4. Взаимодействие пигментов *Phellinus robustus* М-10 и *Inonotus obliquus* В-26 с некоторыми химическими соединениями

Реагент	Пигменты	
	<i>Ph. robustus</i> М-10	<i>I. obliquus</i> В-26
NaOH, 0,5%	Р	Р
HCl разведенная	НР	СР
H ₂ SO ₄ концентрированная	Р	Р
HNO ₃ концентрированная	Р	Р
Хлорэтан	НР	НР
Диметилформамид	СР	НР
Бутанол нормальный	Р	Р
Диэтиловый эфир	НР	НР
Ацетон	НР	НР
Хлороформ	НР	НР
H ₂ O ₂	О	О
Бромная вода	О	О
KMnO ₄	О	О

П р и м е ч а н и е . Р – растворяется; НР – не растворяется; СР – слабо растворяется; О – окисляется.

Как показали наши исследования, 0,1%-ные растворы пигментов грибов в 0,1 н. NaOH в присутствии 10%-го пероксида водорода окислялись и обесцвечивались в течение суток. При добавлении перманганата калия окраска щелочных растворов изменялась с черной, черно-коричневой либо коричневой до зеленой, а затем исчезала и выпадал осадок. Расход KMnO₄ для обесцвечивания меланина *Phellinus robustus* М-10 составил 13, *Inonotus obliquus* В-26 – 11 ммоль/г.

При добавлении к щелочным растворам пигментов дитионита натрия (сильного восстанавливающего агента) в концентрации 2 мг/мл происходило изменение степени окисления препаратов. Это выражалось в изменении

тангенса углов наклона спектров поглощения при длинах волн 250-500 нм с 0,0024 до 0,0025 для *Ph. robustus* M-10 и с 0,0025 до 0,0028 для *I. obliquus* B-26 соответственно.

Как показали наши исследования, 0,1%-ные растворы пигментов грибов в 0,1 н. NaOH в присутствии 10%-го пероксида водорода окислялись и обесцвечивались в течение суток. При добавлении перманганата калия окраска щелочных растворов изменялась с черной, черно-коричневой либо коричневой до зеленой, а затем исчезала и выпадал осадок. Расход KMnO_4 для обесцвечивания меланина *Phellinus robustus* M-10 составил 13, *Inonotus obliquus* B-26 – 11 ммоль/г.

При добавлении к щелочным растворам пигментов дитионита натрия (сильного восстанавливающего агента) в концентрации 2 мг/мл происходило изменение степени окисления препаратов. Это выражалось в изменении тангенса углов наклона спектров поглощения при длинах волн 250-500 нм с 0,0024 до 0,0025 для *Ph. robustus* M-10 и с 0,0025 до 0,0028 для *I. obliquus* B-26 соответственно.

Наблюдалось также выпадение хлопьевидного осадка из щелочных растворов пигментов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 в присутствии 0,5 и 0,8 мг/мл FeCl_3 соответственно и его растворение при избытке хлорида железа.

Исследование элементного состава пигментов показало, что меланин *Ph. robustus* M-10, в отличие от *I. obliquus* B-26, характеризовался более низким содержанием углерода и более высоким содержанием кислорода. В то же время количество водорода и азота в меланине *I. obliquus* B-26 было выше, чем в пигменте *Ph. robustus* M-10 (табл. 5). Присутствие азота в количестве даже 3%, по мнению исследователей (Кукулянская, 2002), не свойственно грибным меланинам, а более характерно для меланинов животного происхождения – эумеланинов.

Известно, что меланиновые пигменты грибов, вызывающих бурую гниль древесины, характеризуются более высоким содержанием углерода в своем составе по сравнению с пигментами грибов, вызывающих белую гниль, к которым относятся изучаемые *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 (Сушинская и др., 2006).

Одной из величин, характеризующих содержание сопряженных структур в молекуле меланина, является соотношение C/N. Из данных табл. 5 следует, что значение этого показателя

примерно в 1,2 раза выше у меланина *Ph. robustus* M-10, чем у пигмента *I. obliquus* B-26. Полученные данные подтверждаются результатами ЭПР-анализа, указывающими на то, что содержание парамагнитных центров выше в меланине *Ph. robustus* M-10 (Бабицкая и др., 2000).

Таблица 5. Элементный состав меланиновых пигментов *Inonotus obliquus* B-26, *Phellinus robustus* M-10

Вид, штамм	Содержание, %				Соотношение		
	С	О	Н	N	O/C	H/C	C/H
<i>Ph. robustus</i> M-10	37,05 ±0,2	52,83± 0,2	5,05 ±0,3	5,07 ±0,2	1,43 ±0,2	0,14 ±0,1	7,54 ±0,3
<i>I. obliquus</i> B-26	38,20 ±0,1	50,46± 0,2	5,54 ±0,2	5,80 ±0,1	1,30 ±0,3	0,15 ±0,2	6,39 ±0,1

Величины, определяющие соотношение водорода к углероду и косвенно указывающие на степень ненасыщенности молекулы, составили 0,14 и 0,15% у *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 соответственно.

Данные табл. 6 свидетельствуют о близких значениях содержания –ОН и карбоксильных групп в меланиновых пигментах изучаемых видов. В то же время, пигменты этих видов отличались по содержанию –ОСН₃ и карбонильных групп. Пигменты, синтезируемые базидиомицетами *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26, имели коричневый либо черно-коричневый цвет. Известно, что природа цветности пигментов темно-окрашенных грибов достаточно сложна (Борисюк и др., 1991).

Для характеристики интенсивности окраски меланиновых пигментов различных грибов принято измерять коэффициенты экстинкции (Е-величины) при различной длине волны. Чаще всего используют поглощение света при 465 нм (E₄₆₅) и 650 нм (E₆₅₀). Соотношение E₄₆₅/E₆₅₀ называют коэффициентом цветности (Панина, 1997). Величина E₄₆₅ численно равна оптической плотности раствора, содержащего 1 мг меланина в 100 мл раствора, при длине волны проходящего света 465 нм. Эта величина используется для сравнения свойств меланинов различного происхождения. По интенсивности окраски,

характеризуемой E_{465} , пигменты изучаемых грибов различны и укладываются в пределы от 0,01 до 0,1, что соответствует литературным данным (Курченко и др., 2005) и характеризует их как меланины (табл. 7).

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить корреляцию между окраской меланинов, коэффициентом цветности и содержанием кислородсодержащих карбонильных групп: чем интенсивнее окраска меланиновых пигментов, тем выше коэффициент их экстинкции, содержание в них карбонильных групп и сопряженных структур. По мнению многих авторов, окисление ОН-групп до карбонильных увеличивает интенсивность окраски за счет появления двойной С=О-связи и увеличения цепи сопряжения (Борисюк и др., 1991; Mironenko, 2000).

Меланиновые пигменты, независимо от природы, содержат большое количество стабильных ПМЦ, что обеспечивает меланинам большую электронноабсорбционную емкость и придает им свойства радио- и фотопротекторов, дезактиваторов природных радикалов, образующихся в ряде физических и химических процессов (Ito et al., 2000). В меланине *I. obliquus* В-26 концентрация ПМЦ составила $4,5 \times 10^{17}$ спин/г, в меланине *Ph. robustus* – 6×10^{17} спин/г (см. табл. 7), что согласуется с данными других авторов (Ito et al., 2000).

В пигментах *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 зарегистрировано ЭПР-поглощение (ΔH) в виде ассиметричных синглетных сигналов без сверхтонкой структуры с величиной g-фактора 2,0035 и 2,0037 соответственно. Значение ΔH для меланина *I. obliquus* В-26 составило 7,8 Гс, для меланина *Ph. robustus* – 4,9 Гс. Регистрация такого сигнала ЭПР служит идентификационной характеристикой всех исследованных природных меланинов (Щерба и др., 1998; Jacobson, Tinner, 1993).

Молекулярная масса пигментов из мицелия *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 находилась в пределах 55 ± 5 кДа, что характеризует их как высокомолекулярные соединения (рис. 1, 2). По литературным данным (Epochs et al., 1993), молекулярная масса меланинов базидиальных грибов составляет 100 кДа, а также присутствует низкомолекулярная фракция с молекулярной массой несколько сотен дальтон.

Таблица 6. Содержание функциональных групп в меланиновых пигментах *Phellinus robustus* M-10 и *Inonotus obliquus* B-26

Вид, штамм	Содержание функциональных групп, %					
	-OCH ₃	-OH			Карбонильные CO	Карбоксильные COOH
		общие	алифатические	фенольные		
<i>Ph. robustus</i> M-10	Следы	16,90±0,02	14,98±0,01	1,92±0,03	2,55±0,02	1,20±0,02
<i>I. obliquus</i> B-26	0,96±0,03	16,90±0,02	15,65±0,02	1,25±0,02	1,05±0,02	0,93±0,01

Таблица 7. Физико-химическая характеристика меланиновых пигментов *Phellinus robustus* M-10 и *Inonotus obliquus* B-26

Вид, штамм	-CO- группы	E ₄₆₅	E ₆₅₀	E ₄₆₅ /E ₆₅₀	Окраска пигмента	Концентрация ПМЦ, спин/г
<i>Ph. robustus</i> M-10	2,55±0,02	0,025	0,004	6,25	черно-коричневая	4,6x10 ¹⁷
<i>I. obliquus</i> B-26	1,05±0,02	0,020	0,005	4,00	коричневая	4,5x10 ¹⁷

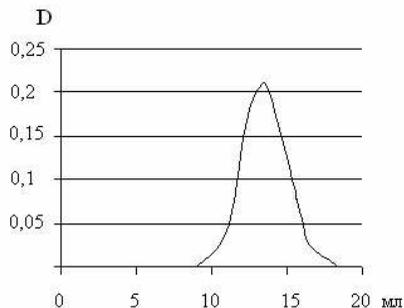


Рис. 1. Гель-хроматограмма меланина *Phellinus robustus* M-10

На рис. 3 представлены спектры поглощения пигментов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Они имеют форму наклонных кривых, характерных для меланинов грибного происхождения, значения тангенса углов их наклона в волновом диапазоне 250-500 нм составляли 0,0024 и 0,0025 соответственно.

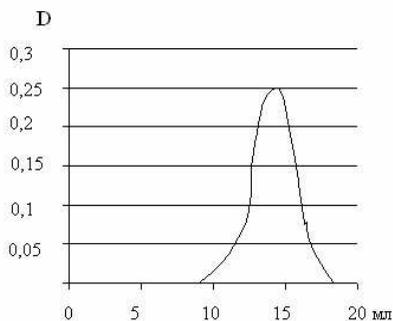


Рис. 2. Гель-хроматограмма меланина *Inonotus obliquus* B-26

Щелочерастворимые фракции пигментов изучаемых грибов поглощают слабее в видимой области спектра. Меланин *Ph. robustus* M-10, в отличие от пигмента *I. obliquus* B-26, характеризовался более интенсивным поглощением в области 270-280 нм, что соответствует и более высокому содержанию сопряженных структур, о чем свидетельствует соотношение C/H (табл. 5).

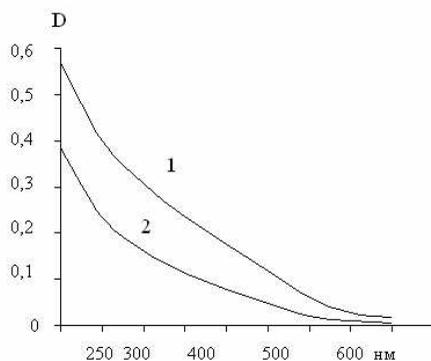


Рис. 3. Поглощение в УФ- и видимой областях спектра:
 1 – меланин *Phellinus robustus* M-10; 2 – меланин *Inonotus obliquus* B-26

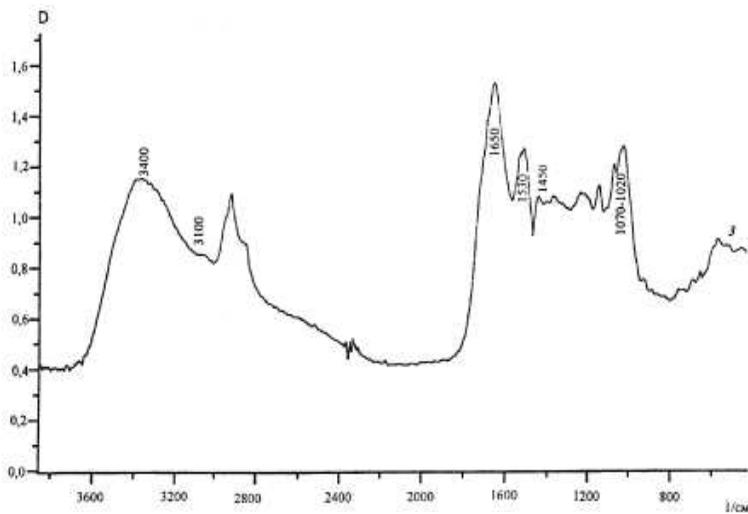


Рис. 4. ИК-спектр меланинового пигмента *Phellinus robustus*
 M-10

Сочетание высокой интенсивности светопоглощения в УФ- и видимой областях спектра с высокой концентрацией ПМЦ (см. табл. 7) позволяет рассматривать меланиновые пигменты

грибов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 как потенциальные сорбенты и фотопротекторы (Babitskaya et al., 2007).

ИК-спектры поглощения не позволяют получать данные о структуре меланинов, но являются важной идентификационной характеристикой, поскольку выявляют присутствие характерных функциональных групп и наличие определенных связей в молекуле (Щерба, 2005).

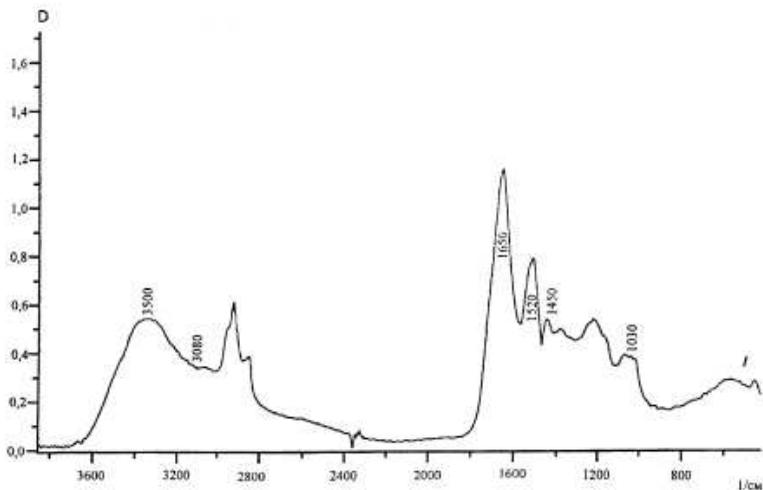


Рис. 5. ИК-спектр меланинового пигмента *Inonotus obliquus* B-26

В ИК-спектрах пигментов, выделенных из *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26, имеется ряд полос, характерных для меланинов грибного происхождения. Широкие полосы в областях 3300-3400 и 3000-3300 см^{-1} , обусловленные валентными колебаниями гидроксильных и амидных водородсвязанных групп; сильные полосы при 1660-1650 и 1520-1530 см^{-1} , соответствующие валентным колебаниям C=O и NH-групп вторичных амидов; полосы средней интенсивности в области 1040 и 1450-1400 см^{-1} обусловлены, очевидно, деформационными колебаниями спиртовых гидроксильных и метиленовых группировок. Наиболее интенсивная полоса в области 1710-1580 см^{-1} является характерной для меланинов (рис. 4, 5).

Таким образом, результаты наших исследований, а также литературные данные (Nicolaus, 1968; Prota, 1992; Butler, Day, 1998) позволяют отнести пигменты, выделенные из мицелия грибов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 при их выращивании на агаризованных средах, к истинным меланинам.

Факторы, влияющие на рост *Phellinus robustus* M-10 и *Inonotus obliquus* B-26 и образование меланина в глубинной культуре

Одним из приоритетных направлений развития современной микробиологии и биотехнологии является разработка технологий с использованием высших базидиальных грибов для получения биологически активных соединений, обладающих лечебными свойствами. В последние годы наметилась положительная тенденция по созданию новых лекарственных препаратов, диетических и функциональных пищевых добавок на основе грибов.

Установлено, что биологически активные вещества, выделенные из глубинного мицелия и культуральной жидкости, по спектру действия не уступают, а нередко даже превосходят соединения, полученные из плодовых тел. Глубинное культивирование позволяет интенсифицировать процесс выращивания: осуществлять направленный синтез целевых метаболитов, повышать продуктивность штаммов, получать продукты с заданными свойствами.

Результаты наших экспериментов показывают, что штаммы *Ph. robustus* и *I. obliquus* растут и образуют меланин при утилизации 14 из 16 исследованных источников углерода. Наибольшую биомассу *Ph. robustus* накапливал на средах с фруктозой, крахмалом, мальтозой, арабинозой, ксилозой и глюкозой (табл. 8), *I. obliquus* – на средах с ксилозой и глюкозой (табл. 9).

Источники углерода оказывали значительное влияние на содержание меланина в биомассе и культуральной жидкости обоих исследованных видов. Так, если *Ph. robustus* максимальное количество внутриклеточного пигмента синтезировал на среде с натрием янтарнокислым, то наибольшая концентрация внеклеточного меланина для этого вида наблюдалась на средах с маннитом, крахмалом или сорбитом

(табл. 8). Аналогичный эффект был характерен и для *I. obliquus* – наиболее высокое содержание внутриклеточного меланина отмечено на средах с глюкозой или крахмалом, а внеклеточного – на средах с целлобиозой либо глюкозой (табл. 9). Максимальный общий выход меланина, синтезируемого *Ph. Robustus*, наблюдали на средах, содержащих маннит, крахмал или сорбит (табл. 8), синтезируемого *I. obliquus* – на средах с целлобиозой или глюкозой (табл. 9).

Таблица 8. Влияние различных источников углерода на рост и синтез меланина *Phellinus robustus* M-10

Источник углерода, 1%	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
Глюкоза	5,1±0,4	15,8±1,2	0,54±0,05	0,67±0,03
Ксилота	5,2±0,6	13,1±0,4	0,74±0,02	0,81±0,02
Галактоза	2,9±0,1	12,7±0,8	0,43±0,01	0,47±0,02
Фруктоза	6,7±0,3	9,4±1,7	0,96±0,02	1,02±0,03
Арабиноза	5,5±0,3	45,8±2,9	0,48±0,02	0,73±0,01
Сахароза	4,3±0,5	54,7±2,4	0,45±0,01	0,49±0,01
Мальтоза	5,7±0,1	8,1±0,7	1,08±0,05	1,13±0,05
Лактоза	1,6±0,1	41,7±1,7	0,60±0,03	0,67±0,02
Целлобиоза	4,2±0,7	2,9±0,3	0,39±0,01	0,43±0,02
Крахмал	5,8±0,2	31,1±1,8	1,30±0,07	1,48±0,06
Маннит	3,9±0,2	65,5±2,8	1,57±0,10	1,83±0,07
Сорбит	4,4±0,2	28,7±2,1	1,34±0,05	1,43±0,05
Натрий янтарно-кислый	0,9±0,1	126,8±5,2	0,48±0,02	0,59±0,02
Натрий щавелево-кислый	0,7±0,1	следы	следы	следы
Малоновая кислота	1,1±0,2	следы	следы	следы
Ржаная мука	6,8±0,3	12,3±2,0	0,26±0,01	0,34±0,01

Примечание. СБ – сухая биомасса, КЖ – культуральная жидкость.

Изучение влияния источников азотного питания на рост и продукцию меланиновых пигментов у *Ph. robustus* и *I. obliquus* показало, что использование пептона как источника азота в среде положительно влияет на синтез биомассы, а также внутри- и внеклеточных меланинов и общий выход меланина (табл. 10, 11).

Таблица 9. Влияние различных источников углерода на рост и синтез меланина *Inonotus obliquus* B-26

Источник углерода, 1%	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
Глюкоза	5,5±0,3	29,1±0,6	0,65±0,03	0,81±0,02
Ксилота	5,8±0,5	5,1±0,3	0,34±0,01	0,37±0,02
Галактоза	1,9±0,1	28,9±1,4	0,42±0,02	0,47±0,01
Фруктоза	4,6±0,3	11,6±0,4	0,52±0,03	0,60±0,03
Арабиноза	4,5±0,3	10,5±0,6	0,60±0,05	0,65±0,02
Сахароза	1,3±0,1	22,6±1,5	0,41±0,02	0,44±0,03
Мальтоза	3,6±0,5	8,4±0,7	0,49±0,01	0,52±0,04
Лактоза	3,4±0,2	11,3±0,5	0,37±0,01	0,41±0,02
Целлобиоза	4,4±0,2	15,8±0,9	0,80±0,04	0,87±0,05
Крахмал	1,7±0,1	28,7±0,7	0,41±0,02	0,46±0,01
Маннит	3,3±0,1	18,7±0,6	0,56±0,02	0,62±0,05
Сорбит	4,4±0,1	9,2±0,3	0,58±0,03	0,62±0,02
Натрий янтарно-кислый	3,0±0,1	10,4±0,2	0,40±0,02	0,43±0,03
Натрий щавелево-кислый	3,1±0,3	следы	следы	следы
Малоновая кислота	0,5±0,1	следы	следы	следы
Ржаная мука	4,9±0,2	12,6±0,8	0,28±0,04	0,34±0,02

Внесение в питательную среду источников минерального азота способствовало снижению интенсивности меланиногенеза.

Так, содержание внеклеточного пигмента у исследуемых грибов было в среднем в 2-2,5 раза ниже, чем на среде с пептоном, эндомеланина у *Ph. robustus* – в 2-2,5 раза меньше (табл. 10, 11).

Таблица 10. Влияние источников азота на рост *Phellinus robustus* М-10 и синтез меланина

Источник азота	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,6±0,3	19,4±5,0	0,53±0,02	1,23±0,04
NH ₄ NO ₃	3,6±0,4	12,5±3,5	0,71±0,03	1,16±0,04
NH ₄ Cl	3,2±0,1	9,1±1,4	0,78±0,03	1,07±0,07
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,4±0,2	11,8±1,9	0,46±0,01	0,86±0,02
NH ₄ H ₂ PO ₄	3,2±0,3	14,1±2,4	0,65±0,01	1,10±0,07
NaNO ₃	3,4±0,2	14,8±4,7	0,90±0,04	1,39±0,03
KNO ₃	3,5±0,1	11,7±2,8	0,67±0,03	1,08±0,05
Пептон	5,8±0,1	31,0±2,7	1,3±0,05	1,45±0,04

Таблица 11. Влияние источников азота на рост и синтез меланина *Inonotus obliquus* В-26

Источник азота	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,6±0,4	25,6±0,8	0,24±0,01	0,41±0,01
NH ₄ NO ₃	5,2±0,4	25,4±1,2	0,29±0,01	0,42±0,01
NH ₄ Cl	6,3±0,3	27,9±0,9	0,38±0,03	0,56±0,02
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6,2±0,3	24,2±0,5	0,34±0,03	0,49±0,04
NH ₄ H ₂ PO ₄	7,1±0,4	25,4±1,7	0,24±0,02	0,42±0,03
NaNO ₃	4,1±0,2	26,0±0,8	0,30±0,01	0,41±0,03
KNO ₃	5,5±0,1	29,6±1,4	0,40±0,02	0,36±0,02
Пептон	5,5±0,3	29,1±0,6	0,65±0,03	0,81±0,02

Известно, что ферменты фенолоксидазного комплекса базидиальных грибов (о-дифенолоксидаза, лакказа), прини-

мающие участие в синтезе предшественников меланина, являются медьзависимыми (Лях, 1981).

Нами было изучено влияние различных концентраций меди в питательной среде на образование меланина.

Повышение концентрации ионов меди в среде до 0,012% приводило к увеличению продукции эндомеланина *Ph. robustus* в 2 раза, экзомеланина – в 1,5 раза по сравнению с контрольной средой (табл. 12).

Таблица 12. Влияние концентрации ионов меди в питательной среде на величину биомассы и образование меланина *Phellinus robustus* M-10

Концентрация ионов меди в среде, %	Биомасса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
0	5,4±0,3	27,8±0,5	1,30±0,07	1,45±0,06
0,001 (контроль)	5,5±0,1	87,2±0,8	1,01±0,05	1,49±0,03
0,002	5,8±0,5	98,3±1,4	1,05±0,03	1,62±0,05
0,003	5,6±0,2	94,6±1,7	1,10±0,03	1,63±0,05
0,004	6,1±0,1	101,7±0,9	1,13±0,01	1,75±0,03
0,008	5,8±0,2	105,2±1,8	1,34±0,02	1,95±0,07
0,012	6,2±0,4	156,5±2,4	1,54±0,03	2,51±0,05
0,016	5,8±0,2	101,7±2,7	1,15±0,03	1,74±0,04
0,020	6,1±0,3	100,3±0,9	0,98±0,01	1,59±0,02

Дальнейшее увеличение содержания меди в питательной среде приводило к снижению продукции меланина. Подобное явление наблюдали для *I. obliquus* при наличии концентрации ионов меди в среде 0,008% (табл. 13).

Дополнительное внесение в питательную среду возможных предшественников меланиновых пигментов служит одним из факторов, регулирующих меланиногенез грибов (Лях, 1981; Макодей, 1994).

Таблица 13. Влияние концентрации ионов меди в питательной среде на величину биомассы и образование меланина *Inonotus obliquus* B-26

Концентрация ионов меди в среде, %	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
0	5,4±0,4	11,1±0,6	0,53±0,03	0,59±0,02
0,001 (контроль)	5,5±0,6	32,7±0,4	0,54±0,02	0,72±0,03
0,002	5,6±0,1	26,8±0,8	0,64±0,01	0,79±0,03
0,003	5,8±0,3	46,5±1,8	0,68±0,03	0,95±0,04
0,004	5,8±0,3	101,7±2,0	0,70±0,03	1,29±0,01
0,008	5,9±0,5	116,9±2,5	0,95±0,01	1,64±0,05
0,012	5,8±0,1	64,9±1,7	0,75±0,04	1,12±0,03
0,016	5,9±0,1	44,1±1,5	0,65±0,02	0,91±0,03
0,020	5,8±0,7	27,6±0,5	0,58±0,02	0,74±0,02

Таблица 14. Влияние различных ароматических соединений на величину биомассы и меланиногенез *Phellinus robustus* M-10

Ароматическое соединение, 0,02%	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
Фенол	5,8±0,3	65,6±0,8	0,71±0,03	1,09±0,02
Пирокатехин	6,8±0,2	176,5±1,4	1,75±0,02	2,95±0,02
Тирозин	7,5±0,4	205,3±0,7	1,87±0,01	3,41±0,01
2-нафтол	5,7±0,1	64,9±2,3	0,65±0,06	1,02±0,03
Бензойная кислота	6,2±0,2	175,8±0,5	1,53±0,02	2,62±0,03
Пара-оксibenзойная кислота	6,4±0,7	168,8±0,9	1,59±0,04	2,67±0,04
Контроль	6,1±0,2	155,7±1,4	1,55±0,02	2,50±0,04

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ряд моноциклических фенольных соединений (пирокатехин, тирозин, бензойная и пара-оксibenзойная кислоты) в кон-

центрации 0,02% оказывают стимулирующее действие на синтез меланинов. Так, в случае добавления тирозина в среду образование пигмента *Ph. robustus* повышалось в 1,4 раза, *I. obliquus* – в 1,5 раза (табл. 14, 15).

Таблица 15. Влияние различных ароматических соединений на меланиногенез *Inonotus obliquus* В-26

Ароматическое соединение, 0,02%	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
		мг/г СБ	г/л КЖ	
Фенол	5,9±0,4	28,8±0,7	0,63±0,02	0,80±0,03
Пирокатехин	6,5±0,2	144,6±1,4	1,12±0,01	2,06±0,01
Тирозин	7,1±0,3	178,8±3,2	1,23±0,04	2,50±0,01
2-нафтол	5,9±0,6	54,23±0,4	0,58±0,02	0,90±0,05
Бензойная кислота	6,0±0,1	136,7±1,7	1,10±0,01	1,92±0,02
Пара-оксибензойная кислота	6,2±0,2	145,2±2,4	1,15±0,03	2,05±0,04
Контроль	5,9±0,5	115,3±0,5	0,97±0,01	1,65±0,05

Данные табл. 14, 15 свидетельствуют о том, что фенол и бициклическая добавка 2-нафтол подавляют рост *Ph. robustus* и *I. obliquus* и образование ими меланиновых пигментов.

Проведенные исследования позволили оптимизировать состав питательной среды для культивирования *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 с целью получения пигментов фенольной природы. Модифицированная глюкозо-пептонная среда имела следующий состав (г/л):

- для *Ph. robustus* М-10: крахмал – 20; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; пептон – 3; кукурузный экстракт – 2 мл; ионы меди – 0,012 %; тирозин – 0,2, вода – 1 л;
- для *I. obliquus* В-26 (г/л): глюкоза – 30; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; пептон – 3; кукурузный экстракт – 2 мл; ионы меди – 0,008 %; тирозин – 0,2, вода – 1 л.

В результате оптимизации питательной среды общий выход меланина у *Ph. robustus* М-10 составил 3,4 г/л, эндомеланина –

1,5 г/л, экзомеланина – 1,9 г/л, биомассы – 7,5 г/л. Продукция меланина у *I. obliquus* В-26 увеличилась до 2,5 г/л, в т.ч. эндомеланина – до 1,3 г/л, экзомеланина – до 1,2 г/л, выход биомассы – до 7,1 г/л.

Влияние физических параметров среды культивирования на продуктивность меланинсинтезирующих грибов

Одним из важных факторов, регулирующих рост и метаболизм высших базидиальных грибов в глубинной культуре, является кислотность питательной среды. Этот фактор обуславливает физиологическую активность культур, а также влияет на свойства клеточных стенок, транспорт питательных веществ, скорость роста и характер метаболизма, способность усваивать те или иные источники питания. Большинство грибов растут в широком диапазоне активной кислотности, хотя для многих оптимальные значения рН составляют 5-6.

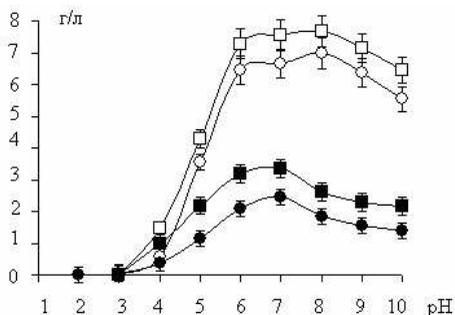


Рис. 6. Влияние исходного pH среды на рост грибов *Phellinus robustus* М-10, *Inonotus obliquus* В-26 и образование меланина в глубинной культуре. *Ph. robustus* М-10: –□– биомасса, –■– меланин; *I. obliquus* В-26: –○– биомасса, –●– меланин

Исследование влияния исходных значений кислотности среды на образование меланина у *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 показало, что грибные культуры растут и синтезируют меланин в диапазоне значений рН 5-10. Для

накопления биомассы оптимальный интервал pH составил 6-9, для образования меланиновых пигментов – 6-7 (рис. 6).

Таблица 16. Влияние интенсивности аэрации на образование биомассы и меланина *Phellinus robustus* M-10

Объём среды, мл	Скорость растворения кислорода, г O ₂ /л·ч	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
			мг/г СБ	г/л КЖ	
30	0,71	8,7±0,3	134,5±3,4	1,85±0,02	3,02±0,04
50	0,55	9,2±0,1	178,3±0,5	1,93±0,01	3,57±0,02
100	0,325	8,9±0,2	177,5±1,7	1,90±0,03	3,48±0,01
200	0,155	6,8±0,2	142,6±2,8	1,63±0,04	2,60±0,06
300	0,115	4,3±0,4	127,9±1,2	1,25±0,02	1,80±0,02
400	0,085	2,8±0,6	85,7±2,4	1,01±0,02	1,25±0,03

Таблица 17. Влияние интенсивности аэрации на образование биомассы и меланина *Inonotus obliquus* B-26

Объём среды, мл	Скорость растворения кислорода, г O ₂ /л·ч	Био-масса, г/л	Содержание меланина		Общий выход меланина, г/л
			мг/г СБ	г/л КЖ	
30	0,71	7,9±0,2	129,1±0,9	1,14±0,03	2,16±0,01
50	0,55	8,5±0,4	160,2±0,7	1,32±0,01	2,68±0,01
100	0,325	8,1±0,2	159,3±1,4	1,30±0,02	2,59±0,04
200	0,155	6,5±0,5	127,7±0,5	1,03±0,01	1,86±0,03
300	0,115	2,8±0,1	67,9±0,3	0,65±0,01	0,84±0,01
400	0,085	2,0±0,3	65,1±2,5	0,32±0,05	0,45±0,01

Стабильно высокая продукция биомассы и меланиновых пигментов у *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 наблюдалась в вариантах опыта с использованием минимального (50-100 мл) объема среды, обеспечивающего высокую аэрацию – 0,325-0,550 г O₂/л·ч. В остальных случаях цвет мицелия варьировал от

светло-бежевого до коричневого, соответственно снижалось и содержание меланина в культуральной среде (табл. 16, 17).

Таким образом, стабильно высокую продукцию меланиновых пигментов у исследуемых видов грибов обеспечивали: исходный рН среды 6,0-8,0, аэрация 0,325-0,550 г O₂/л·ч. Общий выход меланина в таких условиях достигал для *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 3,6-2,7 г/л, в т. ч. эндомеланина 1,6-1,4 г/л, экзомеланина 1,9-1,3 г/л, биомассы 9,0-8,5 г/л соответственно.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭНДО- И ЭКСОМЕЛАНИНОВ *PH. ROBUSTUS* М-10 И *I. OBLIQUUS* В-26

Образование меланинов происходит в результате ферментативного окисления полифенолоксидазами продуктов шикиматного или пентакетидного путей с последующей полимеризацией и конденсацией образовавшихся хинонов. В зависимости от того, где происходит взаимодействие ферментных систем с фенольными соединениями (внутри клеток или во внешней среде), различают внутриклеточные и внеклеточные меланины. Синтез внеклеточных меланинов возможен в результате автоокисления фенолов, а также под действием ферментов фенолоксидазного комплекса, экскретируемых в окружающую среду, что, в основном, свойственно дереворазрушающим грибам. Вследствие этого внеклеточные меланины по своему составу и свойствам могут полностью или частично отличаться от внутриклеточных (Ермаков, 1987).

Поскольку исследуемые грибы накапливают пигменты как в мицелии, так и в культуральной жидкости, представляло интерес сравнительное изучение их состава и физико-химических свойств.

Полученные данные показали, что по элементному составу эндо- и экзомеланины, синтезируемые *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26, почти не отличаются (табл. 18).

Содержание метоксильных групп, алифатических и фенольных гидроксил-радикалов выражалось в величинах, мало отличающихся у обоих видов грибов (табл. 19).

Таблица 18. Элементный состав меланинов *Phellinus robustus* М-10 и *Inonotus obliquus* В-26

Элемент	<i>Ph. robustus</i> М-10		<i>I. obliquus</i> В-26	
	Содержание (%) в меланинах			
	экзо-	эндо-	экзо-	эндо-
С	37,20±0,2	36,90±0,4	37,60±0,3	38,80±0,2
Н	5,08±0,1	5,30±0,2	5,30±0,1	5,78±0,1
N	4,90±0,3	5,20±0,2	5,60±0,2	5,90±0,4

Таблица 19. Содержание функциональных групп в меланинах *Phellinus robustus* М-10 и *Inonotus obliquus* В-26

Функциональные группы, %	Меланин			
	<i>Ph. robustus</i> М-10		<i>I. obliquus</i> В-26	
	экзо-	эндо-	экзо-	эндо-
-OCH ₃	следы	следы	0,82±0,4	0,90±0,2
Алифати-ческие ОН	13,35±0,2	12,50±0,1	15,05±0,2	14,59±0,2
Фенольные ОН	1,88±0,2	2,58±0,3	1,00±0,2	1,48±0,1
Общие гидроксильные	15,23±0,1	15,09±0,2	16,05±0,1	16,07±0,2
Карбонильные	3,80±0,3	1,58±0,1	0,85±0,3	1,00±0,2
Карбоксильные	0,66±0,4	1,28±0,2	0,50±0,2	1,40±0,3

По содержанию карбоксильных радикалов выявлены некоторые отличия: в экзомеланинах исследуемых видов их количество было в 2 раза ниже, чем в эндомеланинах. Количество карбонильных групп в экзомеланине *Ph. robustus* М-10 в 4,5 раза превышало таковые в экзомеланине *I. obliquus* В-26. Интенсивное потемнение среды культивирования вследствие выделения в нее экзомеланина *Ph. robustus* М-10 можно объяснить корреляцией между окраской меланинов, коэффициентом цветности и содержанием кислород-содержащих карбонильных групп (табл. 7).

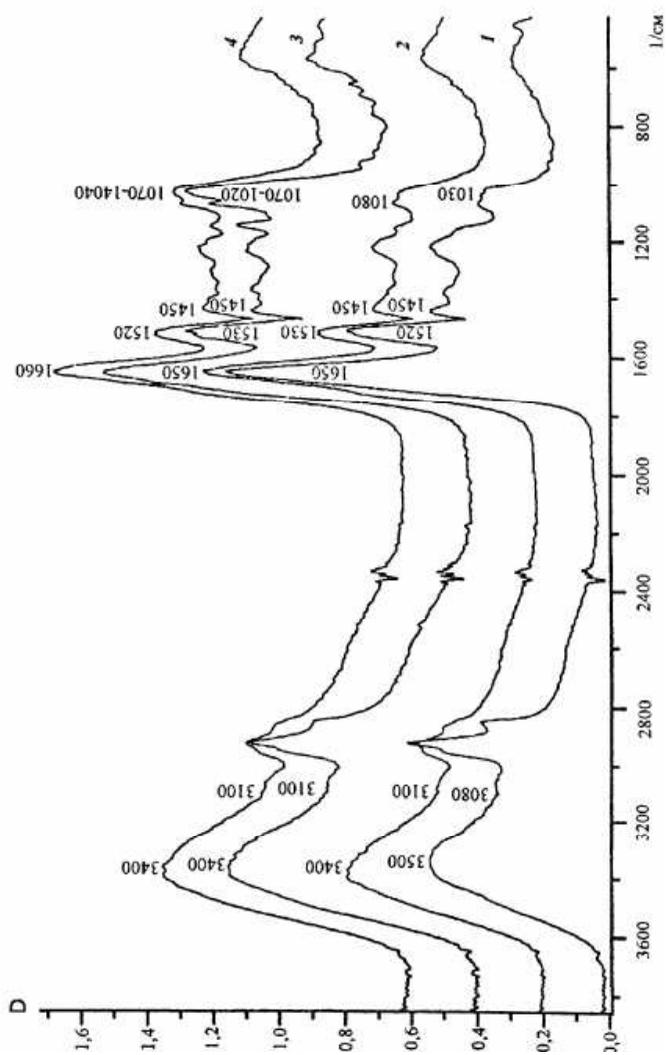


Рис. 7. ИК-спектры меланинов *Phyllinus robustus* M-10 и *Ipoptus obliquus* B-26: 1 – эндо-, 2 – экзомеланин *Ph. robustus*; 3 – эндо-, 4 – экзомеланин *I. obliquus* B-26

Регистрация ИК-спектров поглощения экзо- и эндомеланинов изучаемых видов грибов позволила выявить присутствие характерных для грибных меланинов функциональных групп и определенных связей в молекуле: гидроксильных и амидных водородсвязанных групп (широкие полосы в областях 3300-3400 и 3000-3300 см^{-1}), карбонильных групп вторичных амидов (сильные полосы при 1660-1650 и 1520-1530 см^{-1}), алифатических гидроксильных и метиленовых групп (полосы средней интенсивности в области 1040 и 1450-1400 см^{-1}) (рис. 7).

В составе эндо- и экзомеланинов обнаружено значительное количество азота (4,9-5,9%) (табл. 18). Известно, что меланины, синтезируемые высшими грибами, относятся к пирокатехиновому типу (Щерба и др., 1999) и не должны содержать в своем составе азот. Следовательно, наличие его в меланине обусловлено, по-видимому, присутствием белковых веществ, химически связанных с ядром пигмента. Для подтверждения данного предположения пигменты *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 гидролизуются раствором 6 н. HCl при 120 °C в течение 24 ч с последующим анализом состава аминокислот. Негидролизированные остатки использовали для определения элементного состава и снятия ИК-спектров.

Анализ аминокислотного состава гидролизатов меланинов показал наличие в них семнадцати аминокислот. Сумма их в эндомеланине *I. obliquus* B-26 составила 36,4%, в экзомеланине – 32,2%, у *Ph. robustus* M-10 – 24,68 и 27,39% соответственно (табл. 20).

Исследование элементного состава негидролизированных остатков экзо- и эндомеланинов показало наличие следовых количеств азота (0,2-0,35%).

Результаты ИК-спектроскопии образцов изучаемых пигментов после гидролиза показали исчезновение полос поглощения в областях 1660 и 1550 см^{-1} , свойственных деформационным колебаниям NH-групп, входящих в состав аминокислот. Появление полос поглощения при 1600-1620 см^{-1} , характерных для сопряженной хиноидной структуры, подтверждает ароматическую природу меланиновых пигментов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 (рис. 8а, б).

Таблица 20. Аминокислотный состав белковой части меланопротеинов *Phellinus robustus* M-10 и *Inonotus obliquus* B-26

Аминокислота	Содержание аминокислоты, % суммы аминокислот			
	<i>Ph. robustus</i> M-10		<i>I. obliquus</i> B-26	
	Экзо-меланин	Эндо-меланин	Экзо-меланин	Эндо-меланин
Лизин	2,77	6,28	3,80	4,14
Гистидин	1,6	2,96	1,82	2,94
Аргинин	2,99	1,9	6,72	3,07
Треонин	4,49	1,54	3,75	2,83
Серин	5,32	1,43	4,28	2,88
Пролин	9,34	7,15	8,15	6,98
Глицин	16,63	7,27	15,52	6,46
Аланин	7,93	6,46	8,00	6,27
Валин	5,13	6,76	3,46	5,78
Цистин	1,84	-	2,48	-
Метионин	следы	следы	следы	следы
Лейцин	8,16	16,87	8,30	18,09
Изолейцин	3,06	4,19	3,38	4,37
Тирозин	0,57	4,48	1,04	2,79
Фенилаланин	1,80	5,64	2,26	4,72
Аспарагиновая к-та	9,09	9,19	7,68	6,97
Глутаминовая к-та	19,28	17,88	19,36	21,71

(-) – Отсутствие аминокислоты.

Гель-хроматография пигментов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 показала, что молекулярная масса эндо-меланинов составляет 55 ± 5 кДа, экзо-меланинов – 40 ± 5 кДа (рис. 9, 10). Кривая элюирования растворов меланинов имела четко выраженный пик и растянутое «плечо», что свидетельствует об однородности пигментов.

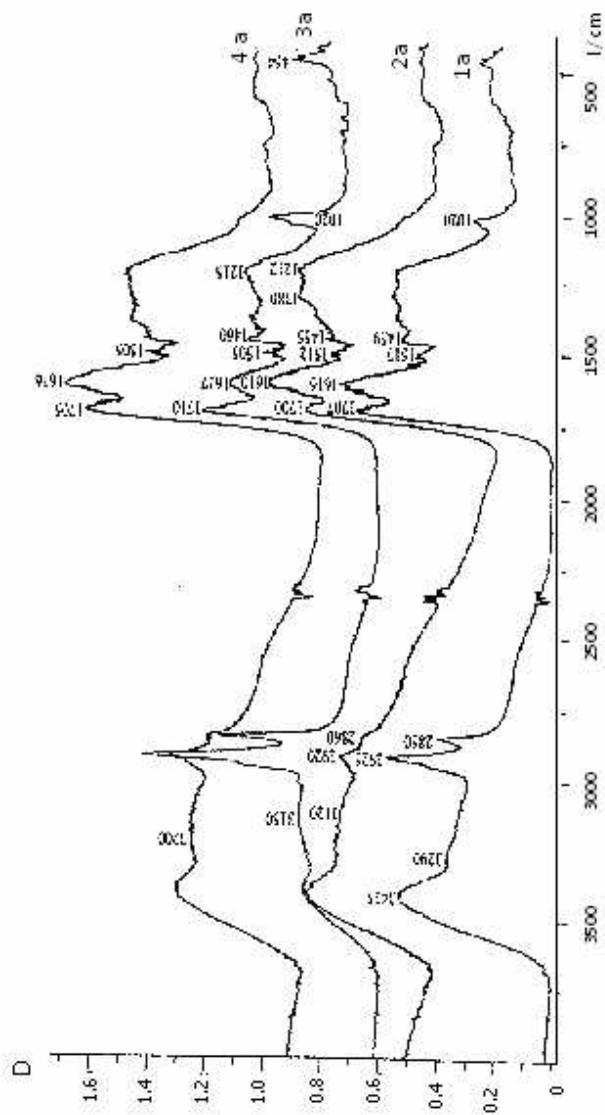


Рис. 8а. ИК-спектры меланинов *Iponotus obliquus* В-26 и *Phellinus robustus* М-10 до гидролиза пигментов:
 1 – эндо-, 2 – экзомеланины *I. obliquus* В-26; 3 – эндо-, 4 – экзомеланины *Ph. robustus* М-10

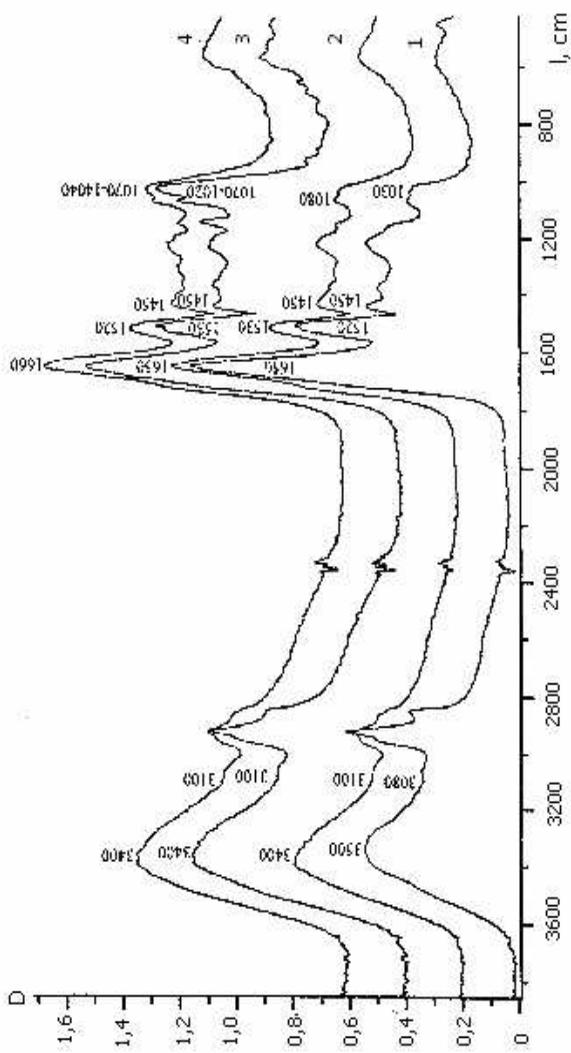


Рис. 86. ИК-спектры меланинов *Inoplotus obliquus* В-26 и *Phellinus robustus* М-10 после гидролиза пигментов:
 1а – эндо-, 2а – экзомеланины *I.obliquus* В-26; 3а – эндо-, 4а – экзомеланины
Ph. robustus М-10

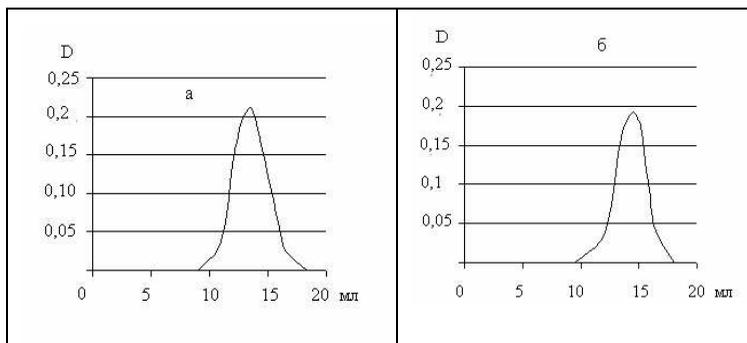


Рис. 9. Гель-хроматограмма меланинов *Phellinus robustus* M-10:

а – эндо-, *б* – экзомеланин

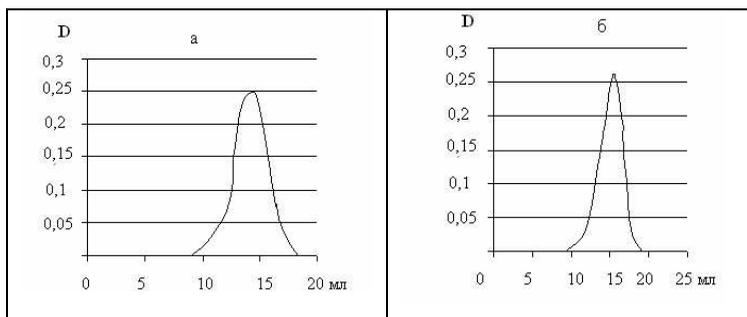


Рис. 10. Гельхроматограмма меланинов *Inonotus obliquus* B-26:

а – эндо-, *б* – экзомеланин

Результаты проведенных исследований показали, что внутриклеточные и внеклеточные пигменты *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 являются меланопротеинами с содержанием аминокислот в эндомеланинах 24,7 и 32%, в экзомеланинах 27,4 и 36,4% соответственно.

Установлено, что внутриклеточные и внеклеточные пигменты изучаемых видов грибов близки между собой по молекулярным массам, оптическим свойствам, элементному составу, содержанию функциональных групп и спектральным характеристикам (Babitskaya et al., 2002).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА МЕЛАНИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ, ОБРАЗУЕМЫХ *PHELLINUS ROBUSTUS* M-10 И *INONOTUS OBLIQUUS* B-26

Действие ингибиторов на биосинтез меланина грибами

Разнообразие темнопигментированных грибов в природе предполагает существование различных типов меланиногенеза. Грибные меланины, как известно, связаны с клеточной стенкой, реже они накапливаются вне клетки либо в цитоплазме. Предшественниками меланинов могут быть разнообразные вещества – пирокатехол, дигидроксинафталин, глютаминил-гидроксibenzen, катехоламин, тирозин и др. (Fogarty, 1996).

Современные исследования меланиногенеза у аскомицетов и несовершенных грибов показали, что они в своем большинстве образуют меланин из дигидроксинафталина. Основные этапы биосинтеза пигментов у грибов были изучены путем использования известного ингибитора пентакетидного пути синтеза меланина – фунгицида трициклазола. Определены также основные точки действия трициклазола на меланиногенез (Сухаревич, 2000).

В настоящее время помимо трициклазола известны и другие ингибиторы биосинтеза меланина, блокирующие его на тех же этапах. И если пути образования меланина некоторыми микромицетами в определенной мере изучены, структура меланинов базидиальных грибов остается неразгаданной, до сих пор не известны и ингибиторы меланиногенеза у этих грибов.

С целью определения круга веществ – ингибиторов продукции меланиновых пигментов у исследуемых видов макромицетов был проведен скрининг химических соединений, способных влиять на процесс меланиногенеза. Установлено, что такие ингибиторы меланиногенеза у грибных культур, как аскорбиновая кислота, 3,5-ди-(три-метил)-гидрохинон(β -ионол), кверцетин-3-рутинозид (рутин) во всех исследованных концентрациях не подавляют рост *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 и биосинтез ими пигментов (табл. 21, 22).

Незначительное (~14%) подавляющее действие на синтез меланина у изучаемых грибов оказывал ионол в концентрации 25,0-125,0 мкг/мл. Уменьшение продукции биомассы сопровождалось понижением образования пигмента. Очевидно, происходит торможение роста грибной культуры, а не самого меланиногенеза (табл. 21, 22).

Таблица 21. Влияние химических соединений на рост и образование меланина *Phellinus robustus* M-10

Химическое соединение	Концентрация химического соединения, мкг/мл	Биомасса, г/л	Общий выход меланина, г/л	Активность ферментов	
				Лакказы, ед./г биомассы	Полифенолоксидаза, ед./г биомассы
Контроль	0	9,15±0,4	3,46±0,01	0,12±1,4	3,75±0,5
Ионол	5	8,76±0,3	3,30±0,03	0,10±0,5	3,78±0,3
	25	8,58±0,2	2,74±0,01	0,11±0,8	2,34±0,3
	125	8,09±0,1	2,63±0,02	0,10±0,9	2,30±0,1
Рутин	2	9,79±0,4	3,57±0,03	0,16±1,5	4,28±0,2
	10	9,21±0,2	3,80±0,02	0,18±1,4	4,30±0,2
	50	9,47±0,3	4,07±0,04	0,19±1,1	4,32±0,4
Аскорбиновая кислота	10	9,36±0,1	3,30±0,01	0,18±0,4	4,30±0,8
	50	10,07±0,2	4,14±0,01	0,23±0,6	4,63±0,2
	250	10,01±0,4	4,60±0,02	0,25±0,4	4,65±0,6
Койевая кислота	50	9,95±0,2	3,05±0,01	0,10±0,6	2,51±0,9
	250	9,68±0,2	2,91±0,02	0,08±1,3	2,17±1,2
	500	9,72±0,2	2,48±0,04	0,05±1,2	1,13±0,1
	1000	9,08±0,1	следы	следы	следы

Аскорбиновая кислота и рутин в исследованных концентрациях не подавляли синтез меланина, а стимулировали его. Увеличение выхода мицелиальной массы сопровождалось увеличением продукции пигмента и синтеза ферментов (табл. 21, 22).

Таблица 22. Влияние химических соединений на рост и образование меланина *Inonotus obliquus* В-26

Химическое соединение	Концентрация химического соединения, мкг/мл	Биомасса, г/л	Общий выход меланина, г/л	Активность ферментов	
				Лакказы, ед./г биомассы	Полифенолоксидаза, ед./г биомассы
Контроль	0	8,30±0,3	2,64±0,02	0,20±0,6	4,51±0,3
Ионол	5	7,32±0,1	2,40±0,02	0,18±0,8	4,58±0,8
	25	7,60±0,2	2,35±0,04	0,15±1,8	4,20±0,4
	125	7,47±0,5	2,08±0,01	0,12±2,0	4,17±0,6
Рутин	2	8,57±0,4	2,78±0,05	0,22±1,7	5,08±1,4
	10	9,20±0,2	3,16±0,01	0,28±1,5	5,13±2,0
	50	9,00±0,7	3,25±0,02	0,28±0,9	5,18±0,8
Аскорбиновая кислота	10	8,19±0,1	2,82±0,04	0,31±0,5	4,82±0,3
	50	9,20±0,6	3,20±0,02	0,40±0,3	5,20±0,5
	250	9,14±0,2	3,75±0,03	0,46±0,3	5,60±0,1
Койевая кислота	50	8,25±0,3	1,80±0,02	0,2±0,5	3,60±0,1
	250	7,98±0,3	1,72±0,03	0,12±0,2	2,46±0,3
	500	8,12±0,2	1,09±0,01	0,08±0,6	1,15±0,1
	1000	8,18±0,1	следы	следы	следы

При концентрации аскорбиновой кислоты 50 мкг/мл синтез полифенолоксидазы у грибов *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 увеличивался в 1,2-1,3 раза, лакказы – в 2 раза. Рутин в изученных концентрациях стабильно стимулировал синтез ферментов изучаемых видов грибов, ответственных за образование пигментов: лакказы в 1,4-1,6 раза, полифенолоксидазы – в 1,2 раза.

Только койевая кислота в концентрации 1000 мкг/мл практически полностью подавляла синтез полифенолоксидазы (тирозины), существенно не влияя на рост культур *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26. Пигментация мицелия, сформировавшегося на среде с ингибитором, отсутствовала.

Таким образом, выявлен новый ингибитор меланиногенеза у исследуемых базидиальных грибов – койевая кислота, на 70-75% подавляющая активность полифенолоксидазного комплекса.

Идентификация предшественников меланиновых пигментов

По данным литературы (Gu et al., 2005), высшие базидиальные грибы могут синтезировать меланин из глютаминилгидроксибензена, используя при этом тирозин или дигидроксинафталин. Наряду с этим, ароматические соединения могут образовываться и при циклизации различных сахаров. Такие преобразования протекают по схеме: глюкоза → дифосфорный эфир седогептулезы → шикимовая кислота → пара-оксибензойная кислота, с последующим образованием различных хинонов и меланина.

Исследование образования предшественников меланиновых пигментов у *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 проводили с использованием отобранного ингибитора меланиногенеза – койевой кислоты, поскольку установлено, что внесение ее в среду культивирования в концентрации 1000 мкг/мл полностью подавляет образование меланина. В качестве контроля использовали мицелий грибов, выращенный на питательной среде без койевой кислоты. Выделение предшественников меланиновых пигментов проводили обработкой мицелиальной массы ацетоном.

Хроматографическое исследование ацетоновых экстрактов мицелия *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 в контроле позволило обнаружить соединения с Rf 0,12; 0,17; 0,30; 0,35; 0,46 и 0,90 (рис. 11). Среди них только соединение с Rf 0,46 соответствовало значению хроматографической подвижности пара-оксибензойной кислоты (ПОБК).

УФ-спектр соединения с Rf 0,46 был идентичен со спектром химически чистой ПОБК (рис. 12). В ацетоновом экстракте биомассы, полученной после выращивания грибов с койевой кислотой, ПОБК отсутствовала.

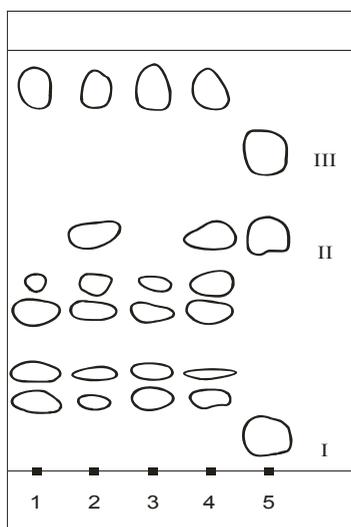


Рис. 11. Хроматограмма ацетоновых экстрактов мицелия *Inonotus obliquus* В-26 и *Phellinus robustus* М-10: 1 – экстракт *I. obliquus* В-26 с ингибитором; 2 – экстракт *I. obliquus* В-26 без ингибитора; 3 – экстракт *Ph. robustus* М-10 с ингибитором; 4 – экстракт *Ph. robustus* М-10 без ингибитора; 5 – смесь фенолокислот: I – протокатеховая кислота (ПКК), II – пара-оксибензойная кислота (ПОБК), III – салициловая кислота

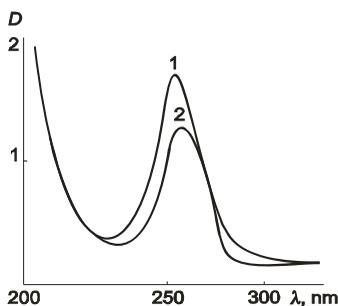


Рис. 12. УФ-спектр пара-оксибензойной кислоты (1) и соединения с Rf 0,46 (2)

Следовательно, наличие ПОБК в мицелии грибов, выращенных без койевой кислоты и отсутствие таковой в мицелии, полученном при выращивании грибов с койевой кислотой, указывает на то, что данный ингибитор действует на стадии образования ПОБК, тем самым ингибируя один из этапов шикиматного пути.

Таким образом, образование меланина у *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 происходит по шикиматному пути, промежуточным продуктом которого является пара-оксибензойная кислота

Исследование продуктов щелочной деградации меланинов

Высокая степень конденсации полимеров не позволяет получать все продукты их деполимеризации, что затрудняет характеристику меланиновых пигментов. Тем не менее, некоторые исследователи (Кукулянская и др., 2004; Jacobson, Tinner, 1993) применяют данный метод для установления типа меланинов. В настоящее время для выявления мономеров, составляющих структуру пигмента, используют окисление перманганатом калия (Jacobson, Tinner, 1993) и сплавление со щелочью (Pethkar, Paknikar, 1998). Однако окисление меланина $KMnO_4$ не всегда приводит к выявлению его структурных единиц. Так, вышеуказанный метод при изучении структуры меланина *Aspergillus nidulans* не позволил обнаружить никаких продуктов его деструкции. Напротив, при сплавлении со щелочью выход мономеров достигал 23,8% (Лях, 1981).

Проведенные нами исследования показали, что при щелочной плавке меланинов, выделенных из *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26, выход продуктов гидролиза составил только 20-23%, что, возможно, объясняется различной структурной организацией пигментов. Учитывая то, что теоретически продукты гидролиза должны составлять 85-95% от исходного, можно предположить, что в результате щелочного гидролиза происходит отщепление лишь боковых цепей меланинового полимера, в то время как основной его скелет не подвергается деградации. Основным продуктом щелочной плавки меланинов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 оказалась протокатеховая кислота (табл. 23, рис. 13).

На основании сравнения полученных нами результатов и данных литературы (Курченко и др., 1991) можно полагать, что меланиновые пигменты *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 относятся к пирокатехиновому типу.

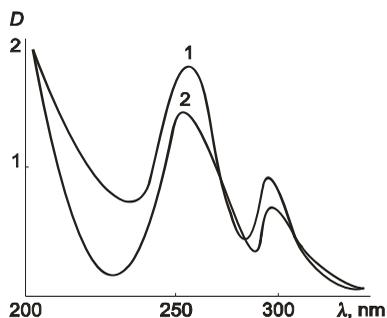


Рис. 13. УФ-спектр протокатеховой кислоты (1) и соединения с Rf 0,23 (2)

Таблица 23. Характеристика продуктов щелочного плавления меланинов

Меланин	Система растворителей	Rf	Идентифицированное соединение	Окраска	
				Видимый свет	УФ-свет
<i>Ph. robustus</i> M-10	Бензол: диоксан: уксусная кислота (150:26:1)	0,23	ПКК	-	Фиолетовая
<i>I. obliquus</i> B-26		0,23	ПКК	-	Фиолетовая
		0,69	Неидентифицированное	-	Голубая

(-) – Отсутствие окраски.

Сорбционная способность меланинов и меланинсодержащей биомассы грибов

Способность меланиновых пигментов связывать токсичные вещества, в т.ч. тяжелые металлы, вероятно, является одной из причин преобладания темноокрашенных грибов в условиях техногенного загрязнения. Высокая активность связывания меланинами токсичных металлов обусловлена большим

разнообразием функциональных групп – карбонильных, карбоксильных, гидроксильных, метоксильных, аминогрупп и др. (Гончарова, Ровбель, 1999).

Сорбирующая способность грибных меланинов в отношении ионов тяжелых металлов позволяет рассматривать содержащую их биомассу в качестве перспективного биосорбента для решения многих экологических задач (Горовой, Косяков, 1996; Goncharova, Babitskaya, 2001). Биомасса грибов может также служить основой для создания энтеросорбентов, корректирующих солевой состав внутренней среды организма человека.

Эффективность сорбции ионов металлов биосорбентами обуславливается как свойствами самого сорбента, так и внешними условиями. Значительное влияние на протекание сорбционного процесса оказывают концентрация ионов металлов, кислотность среды и температура (Mironenko, 2000; Zhdanova, 2000).

В качестве модельного сорбата при изучении влияния указанных факторов на процесс сорбции использовали двухвалентные катионы меди, сохраняющие подвижность в условиях, когда многие другие тяжелые металлы переходят в нерастворимую форму.

Изучение влияния концентрации ионов меди на сорбционную емкость глубинной биомассы грибов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 показало, что в разбавленных растворах количество меди, поглощенное биомассой изучаемых грибов, коррелирует с ее содержанием в исходном растворе. Дальнейшее увеличение концентрации ионов меди повышало сорбционную емкость биомассы *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 с максимумом при 0,2 мг/мл (рис. 14).

Следует учитывать, что сорбция мицелиальной биомассой ионов металлов может происходить как за счет их связывания с функциональными группами сорбента, так и за счет образования связей между сорбированными ионами и ионами, находящимися в растворе (Курченко и др., 2004).

Кислотность среды определяет реакционное состояние металла и сорбента. В щелочных или нейтральных растворах большинство металлов выпадает в осадок, в растворах с

высокой кислотностью ионы H^+ и H_3O^+ могут конкурировать с металлами за центры связывания.

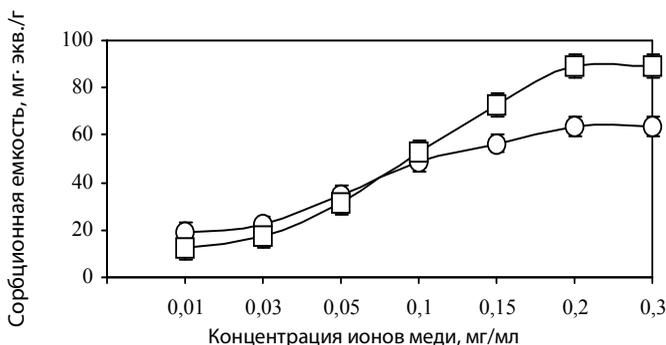


Рис. 14. Влияние концентрации ионов меди на сорбционную емкость меланинсодержащей биомассы грибов.
—□— *Ph. robustus* M-10, —○— *I. obliquus* B-26

Анализ зависимости процесса сорбции от pH среды показал, что эффективность сорбции ионов меди меланинсодержащей биомассой и чистым пигментом изучаемых грибов возрастает по мере приближения растворов к нейтральной области (при значениях pH выше 6 возможно искажение результатов вследствие образования нерастворимой гидроокиси меди) (рис. 15).

Меланин *Ph. robustus* обладал более высокой сорбционной емкостью, чем меланин *I. obliquus* и биомасса обоих изученных видов (рис. 15).

Подкисление растворов ниже pH 5 значительно (в 1,5-1,7 раза) снижало сорбционную емкость мицелия и меланина изучаемых грибов. При pH ниже 4 связывание ионов меди меланином *Ph. robustus* и *I. obliquus* практически прекращалось (см. рис. 15).

Согласно литературным данным, температура оказывает большое влияние на энергозависимые метаболические процессы биосорбции в живом мицелии. Химические процессы

взаимодействия ионов металлов со структурами клеточной стенки, как правило, мало зависят от температуры.

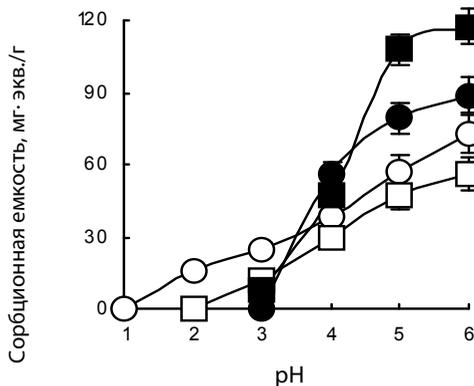


Рис. 15. Влияние pH на сорбцию ионов меди биомассой и меланином *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26.

Ph. robustus M-10: биомасса (□), меланин (■)

I. obliquus B-26: биомасса (○), меланин (●)

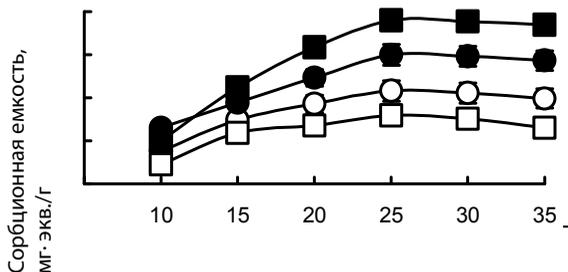


Рис. 16. Влияние температуры на сорбцию ионов меди биомассой и меланином *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26.

Ph. robustus M-10: биомасса (□), меланин (■) *I. obliquus* B-26:

биомасса (○), меланин (●)

Оценка сорбционной емкости по иону меди при различной температуре (от 5 до 35 °С) показала, что температурный оптимум связывания металла пигментом и меланинсодержащей биомассой грибов *Ph. robustus* и *I. obliquus* довольно широк – от 15 до 30 °С (рис. 16).

Селективность сорбции тяжелых металлов меланинсинтезирующими грибами

Сорбенты биологического происхождения обладают широким спектром действия и низкой зольностью, что позволяет решать задачи очистки биологических объектов от различных загрязнений, а при сжигании отработанных сорбентов удается эффективно утилизировать опасные остатки (Горовой, Косяков, 1996; Goncharova, Babitskaya, 2001). Важным преимуществом биосорбентов перед сорбентами химического происхождения является селективность извлечения металлов из растворов и индифферентность к основным биогенным металлам – калию, натрию, кальцию и другим легким элементам (Горовой, 1999).

Изучение предпочтительности сорбции ионов тяжелых металлов как наиболее распространенных поллютантов меланинсодержащей биомассой *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 на основании величины статической обменной емкости позволило расположить их в следующий ряд: $Pb > Cu > Zn > Ni$ (рис. 17).

Предпочтительность сорбции ионов тяжелых металлов чистым меланином *I. obliquus* B-26 представлена следующим образом: $Cu > Pb > Zn > Ni$ (рис. 18).

Меланин *I. obliquus* сорбировал ионы свинца и меди практически одинаково эффективно (рис. 18).

Сорбирующая активность меланина *Ph. robustus* по всем исследованным ионам металлов значительно (в 1,3-1,4 раза) превосходила таковую меланина *I. obliquus* (рис. 17, 18).

У пигмента *Ph. robustus* проявилась селективность в отношении ионов свинца – 3,4 мгэкв./г сорбента, в то время как ионы меди, цинка и никеля сорбировались менее эффективно – $1,8 \pm 0,15$ мг-экв./г сорбента (рис. 17).

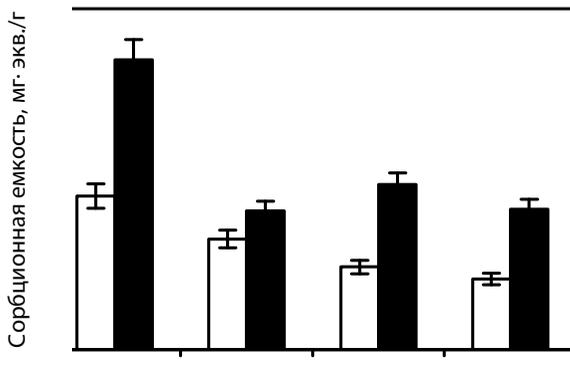


Рис. 17. Сорбция ионов тяжелых металлов *Phellinus robustus* M-10. Биомасса (□); меланин (■)

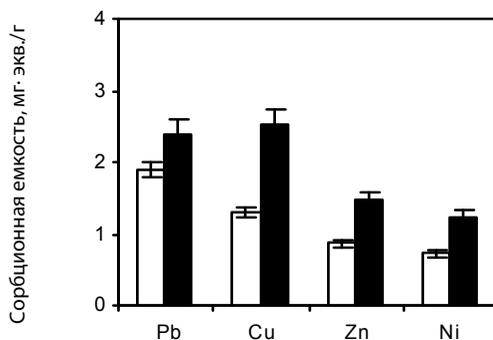


Рис. 18. Сорбция ионов тяжелых металлов *Inonotus obliquus* B-26. Биомасса (□); меланин (■)

Таким образом, исследования показали, что сорбция ионов тяжелых металлов меланинами *I. obliquus* B-26 и *Ph. robustus* M-10 происходит в широком интервале температур (15-30 °С), при близком к нейтральному значению pH среды (6).

Глубинный мицелий меланинсинтезирующих базидиомицетов и выделенные из него меланины обладают высоким

сродством к свинцу, одному из наиболее распространенных и опасных для здоровья людей поллютантов. Выявлено, что сорбционная емкость меланина *Ph. robustus* M-10 в отношении исследованных металлов значительно (в 1,3-1,4 раза) превосходит таковую меланина *I. obliquus* B-26.

Исследование механизмов связывания ионов тяжелых металлов грибными меланинами

Механизмы связывания тяжелых металлов грибными меланинами до сих пор остаются не выясненными. Об изменениях химической структуры меланинов, происходящих в результате их взаимодействия с металлами, позволяют судить результаты ИК-спектроскопии. Меланиновые пигменты, полифенольная природа которых обусловлена наличием системы полисопряжения с парамагнитными свойствами, и комплексы меланинов с ионами меди, железа, свинца и марганца могут быть исследованы также с помощью метода электронного пара-магнитного резонанса (Панина 1997; Senesi, 1990).

Был проведен сравнительный анализ ИК- и ЭПР-спектров нативных меланинов *Ph. robustus* M-10, *I. obliquus* B-26 (H-форма) и пигментов, связанных с ионами меди (Cu-форма) (рис. 19, 20).

ИК-спектры H-формы меланинов изучаемых видов грибов характеризовались наличием интенсивных полос поглощения в области $1650-1600\text{ см}^{-1}$, вызванных валентными колебаниями сопряженных двойных связей полифенолов, а также сильными пиками поглощения карбоксильных групп ($1710-1210\text{ см}^{-1}$). ИК-спектры меланинов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 свидетельствуют о том, что алифатические радикалы пигментов исследованных базидиальных грибов представлены пептидами и являются составной частью меланинов (рис. 19, 20).

Данные ИК-спектроскопии Cu-форм пигментов грибов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 указывают на существенную роль карбоксильных групп в сорбции ионов меди. В ИК-спектре меланинов, связанных с ионами меди, наблюдалось изменение положения полос поглощения, характерное для образования металлоорганических соединений с участием карбоксилатов. Уменьшение интенсивности полос поглощения валентных колебаний карбоксильных групп и увеличение поглощения в

области 1600 и 1400 см⁻¹ свидетельствовало о присутствии карбоксилатионов, образующихся при замещении ионов водорода карбоксильных групп ионами металлов (рис. 19, 20).

Данные ИК-спектроскопии Н- и Си-форм пигментов свидетельствуют о том, что механизмы сорбции тяжелых металлов грибными меланинами включают координационную связь с образованием комплексов типа хелатов. В спектрах Си-форм меланинов по сравнению с Н-формами выявлено уменьшение интенсивности поглощения -C=O амидной группировки (1660 и 3120-3060 см⁻¹), что может быть обусловлено образованием координационной связи металла с азотом амидной группы. Появление сильных полос поглощения в области 1570-1510 и 1270 см⁻¹ характерно также для координационной связи металлов с гидроксильными и другими кислородсодержащими функциональными группами (рис. 19, 20).

Изучение Н- и Си-форм меланинов с помощью ЭПР-спектроскопии показало наличие химической связи между ионом металла и ароматическим ядром пигмента. В образцах Н-форм меланинов регистрировался одиночный слегка асимметричный синглетный сигнал ЭПР без проявления сверхтонкой структуры.

Концентрация парамагнитных центров в меланине *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 составила 4,6x10¹⁷ и 4,5x10¹⁷ спин/г соответственно (табл. 24). Известно, что парамагнитные свойства меланинов являются следствием присутствия в структуре неспаренных электронов, т.е. свободнорадикальных мономеров феноксильной и бензосемихиноновой природы. Поэтому очевидно, что в хелатировании ионов металлов принимают участие гидроксильные и карбонильные группы. Вследствие такого взаимодействия происходит перераспределение электронной плотности в молекулах полимеров меланиновых пигментов и образуются более стабильные структуры, значительно снижается величина g-фактора (Сушинская и др., 2004; Курченко и др., 2005).

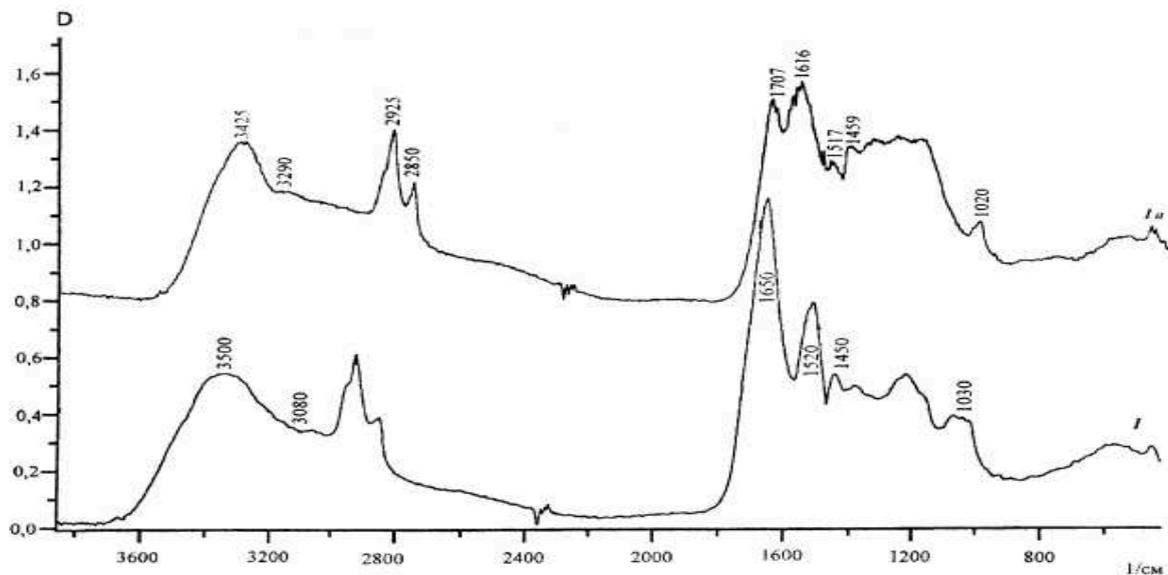


Рис. 19. ИК-спектры нативных и медьсодержащих форм меланина и меланинсодержащей биомассы *Inonotus obliquus* B-26. 1 – Н-форма меланина, 1а – Cu-форма меланина

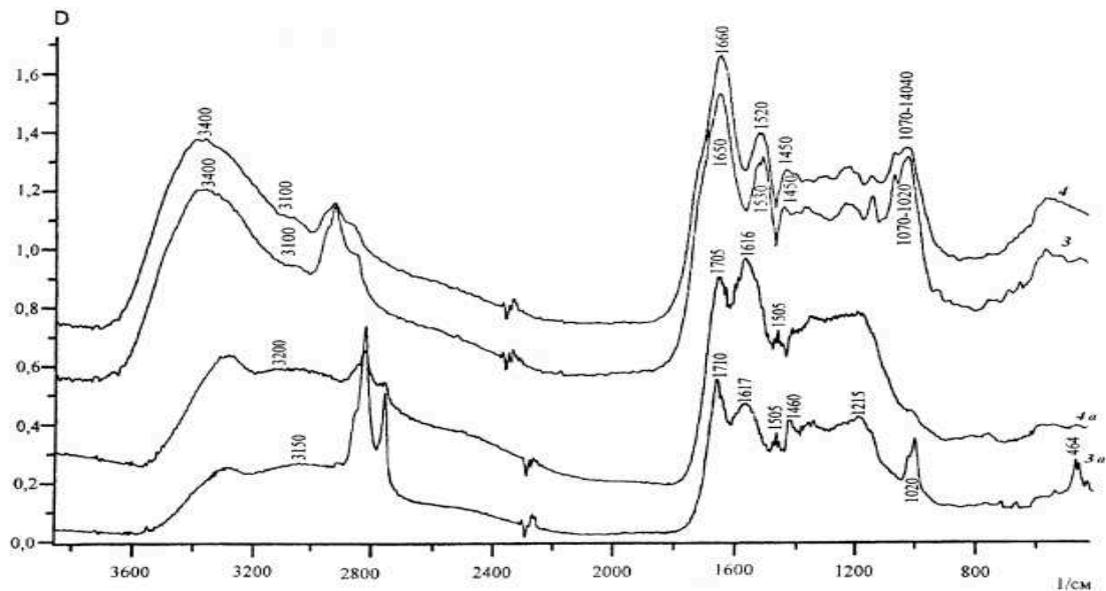


Рис. 20. ИК-спектры нативных и медьсодержащих форм меланина и меланинсодержащей биомассы *Phellinus robustus* M-10: 3 – Н-форма меланина; 3а – Си-форма меланина; 4 – Н-форма биомассы; 4а – Си-форма биомассы

Сигнал органических ПМЦ из ЭПР-спектров меланинов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 полностью исчезал вследствие их взаимодействия с ионами меди. В Cu-формах меланинов изучаемых видов грибов интенсивность сигнала меди была незначительной, что объясняется высокой сорбционной емкостью пигментов по иону меди (70-100 мг/г). Вероятно, значительная часть сорбированного металла связана с функциональными группами, которые находятся в некотором отдалении от ароматических колец.

Благодаря характерному сигналу ЭПР грибные меланины можно изучать методом ЭПР-спектроскопии непосредственно в составе нативной биомассы (Riley, 1997). Основные характеристики ЭПР-спектра пигментированной биомассы гриба *Ph. robustus* M-10 (g-фактор, ΔH) находились в пределах, характерных для природных меланинов. В Cu-форме биомассы *Ph. robustus* M-10, как и у изолированного меланина, сигнал меди полностью гасил сигнал органических ПМЦ, что свидетельствует о возникновении связи металла с ароматическими структурами (табл. 24).

Интенсивность регистрируемого сигнала меди в биомассе *Ph. robustus* M-10 была в 7,6 раза слабее, чем у изолированного меланинового пигмента, что объясняется более низкой концентрацией центров в меланине, способных к комплексообразованию.

Анализ ИК-спектров меланинсодержащей биомассы *Ph. robustus* M-10 до и после сорбции меди позволил установить факт образования карбоксилат-ионов. В то же время изменения спектра после связывания меди были не столь очевидны и характерны, как Cu-формы меланина (табл. 24).

Результаты исследований позволяют предположить, что механизм сорбции включает взаимодействие катионов металлов с карбоксильными группами в молекуле меланина по ионному типу, а также координационную связь с функциональными группами алифатических цепей пигментов.

Таким образом, глубинный мицелий *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26, а также выделенные из него меланины обладают высокой сорбционной емкостью в отношении ионов свинца, меди, цинка, никеля.

Таблица 24. Основные параметры ЭПР-спектров меланиновых пигментов *Phellinus robustus* М-10 и *Inonotus obliquus* В-26

Вид, штамм	Сигнал меланина					Сигнал меди	
	ΔH 0,1 мВт Гц	ΔH 50 мВтГц	g- фактор	ПМЦ 10^{17} спин/г	A/A ₀	ΔH Гц	I 10^8
Н-форма							
<i>Ph. robustus</i> М-10(м)	4,3	4,9	2,0035	4,6	1,60	-	-
<i>Ph. robustus</i> М-10(б)	5,2	6,0	2.0042	3,2	1,88	-	-
<i>I. obliquus</i> В-26(м)	6,3	7,8	2,0037	4,5	2,23	-	-
Cu-форма							
<i>Ph. robustus</i> М-10(м)	-	-	-	-	-	250	4,35
<i>Ph. robustus</i> М-10(б)	-	-	-	-	-	175	0,57
<i>I. obliquus</i> В-26(м)	-	-	-	-	-	250	4,64

м – Изолированный меланиновый пигмент, б – меланинсодержащая биомасса.

Предпочтительность в сорбции ионов свинца меланинами *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 составила величины 3,4 и 2,4 мг-экв./г сорбента соответственно. Показано, что эффективная сорбция осуществляется в широком интервале температур (15-30 °С), при близком к нейтральному (6) значении рН среды, в основе сорбционного процесса лежит взаимодействие катионов металлов с карбоксильными группами по ионному типу, а также координационная связь с функциональными группами алифатических цепей пигментов.

СОЕДИНЕНИЯ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ

Известно, что некоторые микроорганизмы способны синтезировать липиды и высокоактивные липидные компоненты, причем в достаточно больших количествах, что открыло перспективу их производства на основе микробного синтеза и создания нового поколения фармацевтических препаратов. Перспективность микробиологического синтеза липидов очевидна. Это высокая скорость роста микроорганизмов-продуцентов, способность за непродолжительное время накапливать достаточно большую биомассу, возможность целенаправленного воздействия на процесс роста и липогенеза, а также экологически чистое производство. В качестве потенциальных продуцентов липидов среди микроорганизмов рассматриваются, главным образом, дрожжи и низшие мицелиальные грибы, что связано с их способностью активно синтезировать липиды (40-60% сухих веществ) и с уникальным составом последних. Однако, несмотря на значительные успехи, достигнутые в этом отношении, использование низших мицелиальных грибов в биотехнологии имеет ряд недостатков. Одним из них является потенциально опасный их спортивный посевной материал. Кроме того, они в определенных условиях культивирования могут продуцировать микотоксины, являющиеся мутагенами и канцерогенами. Острая же потребность современной фармакологии в новых высокоактивных и малотоксичных препаратах диктует необходимость поиска новых источников их получения.

В этом отношении более перспективным объектом современной биотехнологии среди мицелиальных грибов становятся ксилотрофные базидиомицеты. К тому же многие из них являются съедобными, издавна применяются в народной медицине и признаны лекарственными (Бухало и др., 1996).

В последнее время во многих странах мира (Япония, Германия, Франция, США и др.) высшие базидиальные грибы стали рассматриваться как ценное сырьё для получения биологически активных веществ (БАВ), используемых при создании лечебно-профилактических и лекарственных средств широкого спектра действия (Wasser, 2010).

В большинстве работ, начатых еще в 60-е годы и посвященных изучению липидов базидиомицетов, исследо-

вались в основном плодовые тела этих грибов. Оказалось, что количество липидов у этой группы грибов сравнительно невелико и в зависимости от видовой принадлежности колеблется от 2 до 5%, за редким исключением – до 10%. Однако, судя по научно-информационной литературе, некоторые представители базидиальных грибов способны накапливать в мицелии до 25-50% липидов. Высокое содержание липидов отмечено в плодовых телах некоторых представителей сем. *Polyporaceae*, в частности: *Fomitopsis officinalis* – более 55%, *F. pinicola* – 19%; *Polyporus cristatus* – 17,4% (Ефименко, Агеенкова, 1965; Шиврина, 1965).

Качественный и количественный состав липидов базидиомицетов значительно варьирует в зависимости от стадии цитодифференцировки. Так, в базидиоспорах особенно много липидов (до 50% АСБ), которые могут быть использованы как источники линолевой, линоленовой, эруковой, арахидоновой полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и ценных фосфолипидов – фосфотидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА) и кардиолипина (Михайлова, 1993; Феофилова и др., 1999). В Китае запатентован способ экстракции липидов из базидиоспор лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* (Xin et al., 2001a, b).

Очень мало работ посвящено изучению состава липидов глубинного мицелия базидиальных грибов. Поскольку цели и методические подходы проведенных ранее работ были направлены на решение проблем, связанных в основном с получением плодовых тел, имеющиеся сведения о физиолого-биохимических характеристиках, питательных потребностях, условиях, способствующих повышенному синтезу биоактивных липидных компонентов большинства базидиальных грибов, выращиваемых глубинным способом, весьма ограничены, а иногда и противоречивы. Это может быть связано с применением различных условий культивирования, питательных сред, использованием разных методов экстракции липидов, а также биологическими особенностями различных видов штаммов грибов, находящихся в разных фазах развития (Капич и др., 1990; Феофилова и др., 1998).

В зависимости от физиологической принадлежности (белая, бурая гниль) способность базидиальных ксилотрофов к синтезу липидов различна. Так, например, было отмечено, что содер-

жание липидов в мицелии гриба *Laetiporus sulphureus* (бурая гниль) при культивировании его на среде с сахарозой может достигать 57% (Nour el Dein, Abdallah, 1967), что позволяет отнести его к истинным липидным продуцентам.

По сравнению с грибами бурой гнили, грибы белой гнили, к числу которых относятся и лекарственные грибы *Lentinus edodes* и *G. lucidum*, синтезируют меньшее количество липидов (5-10% АСБ). В то же время для липидов грибов этой физиологической группы характерно очень высокое (более 40%) содержание фосфолипидов (ФЛ) в плодовых телах и в глубинном мицелии (Капич, Шишкина, 1993, 1995; Гвоздкова и др., 2000).

В составе липидов базидиальных грибов обнаружены те же жирные кислоты, которые встречаются и у других эукариотных организмов. Жирнокислотный состав липидов представлен гомологичными сериями насыщенных и ненасыщенных кислот с 12-18 атомами углерода в цепочке. Преобладающими среди ненасыщенных жирных кислот, как правило, является линолевая (С 18:2) (от 30-40% и более общей суммы кислот) и олеиновая (С18:1) (10-20%) кислоты, а среди насыщенных – пальмитиновая (С16:0) (20-30% общей суммы кислот). Другие кислоты содержатся в незначительном количестве (Yokokawa, 1980).

Благодаря наличию в грибах биоактивных липидных соединений, обладающих широким спектром физиологического действия, они могут быть использованы в фармакологии, пищевой и косметической промышленности (Капич и др., 2002; Григораш, 2004; Ryuichiro et al., 2004; Satoshi et al., 2004).

Подбором соответствующих факторов можно изменить соотношение фракций и композицию жирных кислот, направить процесс на усиление синтеза биологически ценных липидных соединений: фосфолипидов, ненасыщенных жирных кислот – линолевой, олеиновой, которые являются незаменимыми и имеют большое практическое значение.

Характеристика соединений липидной природы ксилотрофных базидиомицетов: фракционный и жирнокислотный состав

В настоящее время заметно возрос интерес к липидам со стороны медиков и биологов. Прежде всего это связано с теми

функциями, которые липиды выполняют в организме растений, животных и человека. По мнению специалистов, липиды представляют собой очень перспективный и далеко не полностью исчерпанный источник потенциальных лекарственных и диагностических препаратов.

Что же такое липиды? Вследствие большого разнообразия химического строения липидных молекул довольно затруднительно дать краткое определение этой группе природных соединений, поэтому их обычно определяют по признаку общности некоторых физико-химических свойств. Липиды – это маслянистые или жироподобные вещества, содержащие в качестве общего элемента структуры высшие алкильные цепи, ограниченно растворимые в воде и полярных растворителях и извлекаемые из клеток экстракцией малополярными органическими растворителями (бензол, эфир, хлороформ) (Степанов и др., 1991).

В организме липиды являются основными компонентами биологических мембран, служат главной формой запасаения энергии и углерода, могут быть предшественниками других важных соединений (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены), выполняют роль защитных барьеров, предохраняющих органы и ткани от термического, электрического и физического воздействий, входят в состав защитных оболочек, предохраняющих от инфекций и излишней потери или накопления воды. Являясь ключевыми компонентами биологических мембран, липиды в их составе обладают свойствами специфических регуляторов внутриклеточных метаболических превращений, участвуют в осуществлении межклеточных взаимодействий, проведении нервного импульса, мышечном сокращении. Эти соединения обеспечивают энергетические потребности клетки, создавая резерв энергии, накапливающейся в ходе биохимических реакций. Они также выполняют важную роль водо- и термозащитного барьера, обеспечивают механическую плотность клеток. Ряд липидных соединений являются витаминами и гормонами (Степанов и др., 1991).

Состав липидов сравнительно сложен и зависит от источника получения (растения, животные, микроорганизмы), методов выделения и многих других факторов. Сложность состава и разнообразие компонентов – причина того, что до

настоящего времени отсутствует единая, общепризнанная научная классификация липидов. Наиболее целесообразными кажутся классификации липидов в зависимости от их химической природы, биологических функций, а также отношения к некоторым реагентам.

Существуют несколько систем классификации липидов. По функциям их подразделяют на резервные и структурные. По отношению к щелочному гидролизу и химической структуре липиды разделяют на омыляемые и неомыляемые (Тюкавкина, Бауков, 1991).

К омыляемым относятся липиды, которые являются настоящими сложными эфирами высших жирных кислот и многоатомных спиртов. При их гидролизе образуются многоатомные спирты и мыла – калиевые или натриевые соли высших жирных кислот, а также некоторые другие компоненты (остатки фосфорной, серной кислот, аминок спирты, углеводы, некоторые аминокислоты и др. соединения).

Неомыляемые липиды не подвергаются щелочному гидролизу, но могут образовывать сложные эфиры с высшими жирными кислотами или высшими спиртами.

Согласно другой системе классификации (Васьковский, 1997), выделяют три крупные группы липидов, различающиеся по химическому строению: I – простые; II – сложные; III – оксипипиды. В группу простых липидов наряду с жирными кислотами входят соединения, содержащие одну длинную углеводородную цепь с функциональной группой, образованной из карбоксильной, или утратившие карбоксил. В настоящее время известно свыше 800 природных жирных кислот. По степени ненасыщенности основные жирные кислоты делят на три группы: 1) насыщенные (16:0 – пальмитиновая; 18:0 – стеариновая); 2) моноеновые (18:1n-9 – олеиновая); 3) полиеновые (18:2n-6 – линолевая; 18:3n-3 – альфа-линоленовая; 18:3n-6 – гамма-линоленовая; 20:4n-6 – арахидоновая; 20:3n-6 – дигомогамма-линоленовая; 22:5n-3 – эйкозапентаеновая; 22:6n-3 – докозагексаеновая).

Наиболее богато пальмитиновой кислотой (почти половина суммы всех жирных кислот) пальмовое масло. В животных жирах и хлопковом масле эта кислота составляет четверть всех

Система классификации липидов (Васьяковский, 1997)



жирных кислот. Стеариновой кислоты обычно в жирах не более 10%. Исключением является бараний жир, в котором ее более 30%. Олеиновой кислоты больше всего в оливковом и подсолнечном маслах (около 80%). В других жирах и маслах ее содержится от 5 до 40% (Васьковский, 1997).

Главной жирной кислотой многих растительных масел (подсолнечного, соевого, кукурузного, хлопкового) является линолевая кислота, ее содержание в них составляет 50-70%.

В льняном масле больше всего линоленовой кислоты (Васьковский, 1997).

Жиры рыб и других морских животных богаты полиеновыми (n-3) жирными кислотами – эйкозапентаеновой и докозагексаеновой. Арахидоновая кислота входит в состав фосфолипидов млекопитающих, получают ее чаще всего из печени животных (Alison, 2007).

Для жирнокислотного состава общих липидов грибов различных трофических групп характерно преобладание диеновой C 18:2 кислоты наряду с достаточно высокой (до 1,5) степенью ненасыщенности липидов. При этом отмечают специфические различия между гумусовыми сапротрофами и ксилотрофами – для первых характерно более высокое содержание пальмитиновой кислоты (Alison, 2007).

Производные жирных кислот – спирты, альдегиды, углеводы, сингозиновые основания – биогенетически тесно связаны с жирными кислотами. Эти соединения в небольших количествах присутствуют в живых организмах в свободном виде и их основная функция – строительная (Васьковский, 1997).

Сложные липиды состоят из нескольких блоков, соединенных между собой связями, расщепляющимися при гидролизе, чаще всего сложноэфирными или амидными. В этих липидах могут быть и простые эфирные связи. Сложные липиды обычно делят на две подгруппы – нейтральные и полярные. Нейтральные липиды включают пять основных классов соединений: 1) ацилглицеролы; 2) воска; 3) стеринны и эфиры стериннов; 4) N-ацилэтанол-амиды; 5) церамиды.

Наиболее распространенная в природе группа нейтральных липидов – ацилглицеролы (жиры). Это сложные эфиры трехатомного спирта глицерола и высших жирных кислот. В зависимости от числа этерифицированных спиртовых групп

различают моноацилглицеролы, диацилглицеролы и триацилглицеролы. В зависимости от характера ацильных остатков высших жирных кислот (предельных или непредельных) различают, соответственно, твердые и жидкие жиры (масла). В организме животных и человека (жировой ткани, мембранах) присутствуют смешанные жиры с преобладанием ацильных остатков ненасыщенных жирных кислот. Триацилглицеролы гидрофобны, температура их плавления зависит от степени ненасыщенности жирных кислот. Растительные жиры, содержащие моно- и полиненасыщенные жирные кислоты, имеют более низкую температуру плавления. Степень ненасыщенности характеризуется иодным числом.

Воска – распространённые в растительном и животном мире сложные эфиры высших жирных кислот и одноатомных высших спиртов. Стерины – полициклические спирты, относящиеся к классу стероидов; составная часть неомыляемой фракции животных и растительных липидов. Стерины присутствуют практически во всех тканях животных и растений и являются наиболее распространёнными представителями стероидов в природе. Стерины грибов входят в отдельную группу – микостерины. Главный стерин дрожжей, грибов и ряда простейших – эргостерин.

Церамид (N-ацилсфингозин) является интермедиатом в биосинтезе сфингомиелина и образуется при взаимодействии сфингозина с ацил-CoA. Ацильная группа чаще всего представлена длинноцепочечной насыщенной или моноеновой кислотой. Известно, что церамиды состоят из двух фрагментов: сфингоидного основания (главным образом сфингозина) и жирнокислотного остатка, соединённых амидной связью. Церамиды обладают высокой биологической активностью и могут ингибировать клеточную пролиферацию и стимулировать апоптоз – программированную гибель клеток (Ленинджер, 1985).

Полярные липиды можно разделить на пять классов, сформированных по химическому принципу – наличию в молекуле гетероатома и (или) остатка моносахарида: 1) фосфолипиды, 2) гликолипиды, 3) полярные липиды класса 3, 4) фосфогликолипиды, 5) мышьяколипиды. Во всех живых организмах присутствуют представители только двух первых классов.

Фосфолипиды – омыляемые полярные липиды, при гидролизе которых образуются фосфорная кислота, жирные кислоты, спирты (глицерол, сфингозин), а также аминоспирты и др. соединения. Все фосфолипиды имеют в своем составе гидрофобную часть – неполярные остатки насыщенных и ненасыщенных жирных кислот («хвосты») и гидрофильную – полярную «головку» – остаток глицерина, фосфорной кислоты и аминоспирта, т.е. молекула фосфолипида амфипатична, способна соответствующим образом располагаться на границе раздела двух фаз, что является предопределяющим для образования липидного бислоя мембран.

Фосфатидилхолин – главный фосфолипид большинства живых организмов. Его содержание обычно составляет не менее 50% суммы фосфолипидов. Вторым по значению фосфолипидом обычно является фосфатидилэтаноламин. В большинстве бактерий фосфатидилхолина нет, а более 60-70% их фосфолипидов составляет фосфатидилэтаноламин. Оба липида присутствуют в большинстве растений, для этих организмов очень важен фосфатидилглицерин. Это единственный фосфолипид синезеленых водорослей, главный фосфолипид фотосинтетического аппарата всех растений. Сфингомиелин является важным компонентом клеток эволюционно продвинутых типов животных. В эритроцитах некоторых млекопитающих он заменяет фосфатидилхолин в качестве главного фосфолипида. Заслуживают внимания и несколько других фосфолипидов: фосфатидинозит, дифосфатидилглицерин (кардиолипин), фосфатидилсерин, фосфатидная кислота.

Гликолипиды – сложные липиды, в состав которых входит аминоспирт сфингозин, аминогруппа которого ацилирована остатком жирной кислоты (церамид), а первичная спиртовая группа связана О-гликозидной связью с углеводами. В гликолипидах отсутствует фосфатная группа.

К наиболее распространенным представителям этой группы веществ относятся галактозилцерамид и глюкозилцерамид (цереброзиды). Соединения с сульфогруппой на углеводных остатках называют сульфатидами. Ганглиозиды – представители наиболее сложно построенных гликолипидов. Они представляют большое семейство мембранных липидов, выполняющих, по-видимому, рецепторные функции. Харак-

терной особенностью ганглиозидов является наличие остатков N-ацетилнейраминовой кислоты. Гликолипиды, как и сфингофосфатиды, глицерофосфолипиды, обладают амфифильностью.

До настоящего времени наименее изученными остаются липиды дереворазрушающих базидиомицетов. Е.С. Горшиной с соавт. (2005) изучен липидный состав лекарственного базидиомицета *Trametes pubescens*. Липиды этого вида гриба (2,5-3,5%) включают жирные кислоты, триглицерины, стерины, углеводороды, воска и в полярной части – фосфолипиды. Фракция жирных кислот представлена только соединениями с четным числом атомов углерода (соотношение их во фракциях близко к лучшим растительным маслам) и характеризуется высоким (более 60%) содержанием ненасыщенных жирных кислот (в основном олеиновой и линолевой). Из насыщенных жирных кислот преобладает пальмитиновая. Стериновая фракция представлена в основном тремя компонентами – 5-дигидроэргостерином (8,5% суммы), собственно эргостерином (52,4% суммы) и его 22-дигидроаналогом (39,1%). Эргостерин (дигидроэргокальциферол) относится к группе витамина Д и обладает активностью, составляющей около 40%, сравнимой с активностью самого холекальциферола. Фракция фосфолипидов включает 7 компонентов, основными из них являются фосфатидилсерин (58%), фосфатидилэтаноламин (серин) (24%) и фосфатидилхолин (18%).

Сравнительному исследованию липидного состава ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes*, других ксилотрофов (*Pleurotus ostreatus*, *Khuneromyces mutabilis*) и гумусовых сапротрофов (*Agaricus bisporus*, *A. balchaschiensis*) посвящены работы Е.П. Теофиловой с соавт. (1991). Исследования показали, что плодовые тела грибов содержат не более 5-6% липидов, причем, как правило, их содержание ниже в ножке, чем в шляпке. Это можно объяснить тем, что базидиоспоры, находящиеся в шляпке, очень богаты липидами. Причем у ксилотрофов их содержание может достигать 50%, у гумусовых сапротрофов – 20%, у симбиотрофов – 30-40%. Анализ состава нейтральных липидов и фосфолипидов ксилотрофов *L. edodes* и *P. ostreatus* в сравнении с типичным гумусовым сапротрофом *A. bisporus* также выявил ряд различий. В составе нейтральных липидов *L. edodes* обнаружено повышенное содержание моноацилглицеринов (до 37% суммы нейт-

ральных липидов), свободных жирных кислот (до 22%) и низкий уровень основных запасных липидов – триацилглицеринов (до 5%). Для *P. ostreatus* эти соединения составляют 13,2, 12 и 19,5% , для *A. bisporus* – 7,5, 15 и 28% соответственно (Феофилова, 1991).

Значительное количество работ посвящено сравнительному исследованию фосфолипидов двух основных физиологических групп дереворазрушающих базидиомицетов, обладающих разной способностью к расщеплению лигнина. Показано (Капич, Шишкина, 1993), что грибы бурой гнили (*Gloeophyllum sepiarium*, *Piptoporus betulinus*) в среднем обладают более высоким содержанием липидов в мицелии по сравнению с грибами белой гнили (*Fomes fomentarius*, *Panus tigrinus*) – до 16% сухого мицелия. Липиды грибов белой гнили отличаются более высоким относительным содержанием фосфолипидов – до 24% суммы липидов.

Из литературных данных известно (Weet, 1980) что полярные липиды грибов в основном представлены фосфолипидами, а большую часть общих липидов дереворазрушающих базидиомицетов составляют нейтральные липиды, в основном триглицерины (Капич и др., 1990).

Для изученных видов дереворазрушающих базидиомицетов характерен одинаковый качественный состав фосфолипидов: лизофосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфа-тидилинозит, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, кардиолипин и фосфатидная кислота. Преобладающими фракциями в составе фосфолипидов большинства грибов оказались фосфатидилэтаноламин и кислые фосфолипиды – кардиолипин и фосфатидилглицерин (Капич, Шишкина, 1993). В то же время некоторые авторы называют фосфатидилхолин преобладающей фракцией в составе фосфолипидов грибов большинства систематических групп. Содержание фосфатидилхолина может достигать 35-50% суммы фосфолипидов. Вероятно, данное расхождение результатов указывает на значительное отличие липидного состава дереворазрушающих базидиомицетов от грибов других систематических и экологических групп (Капич, Шишкина, 1993).

Активно изучается жирнокислотный состав липидов грибов (Ratray, Wilkinson, 1988). Грибы образуют насыщенные и не-

насыщенные алифатические кислоты с длиной цепи преимущественно 10-24 углеродных атомов. Основной насыщенной кислотой является пальмитиновая, основной моноеновой – олеиновая, а наиболее распространенной полиеновой – линолевая. Как показали исследования J.D. Weet с соавт. (1980), для большинства представителей базидиальных грибов в жирно-кислотном составе липидов характерно значительное присутствие С 16:0, С 18:1 и С 18:2 кислот с преобладанием линолевой кислоты. Подобная закономерность позже была показана для ряда ксилотрофных базидиомицетов (*P. ostreatus*, *Flammulina velutipes* и др.), в составе липидов которых преобладают линолевая кислота (С 18:2), составляющая до 75% суммы жирных кислот, а также пальмитиновая (С 16:0) – до 30% (Михайлова, 1990; Беспалова, 2002).

Представленные в литературе данные (Феофилова, 1991) о жирнокислотном составе общих липидов грибов различных трофических групп указывают на общую закономерность: значительное преобладание диеновой С 18:2 кислоты и достаточно высокая степень ненасыщенности липидов (от 1,4 до 1,5). Однако в составе жирных кислот существуют специфические различия между гумусовыми сапротрофами (*A. bisporus*, *A. balchaschiensis*) и ксилотрофами (*P. ostreatus*, *K. mutabilis* и *L. edodes*). Для первых характерно высокое содержание пальмитиновой кислоты. В то же время в липидах *L. edodes* отмечен более высокий уровень этой кислоты. Сравнение жирнокислотного состава шляпки и ножки *L. edodes* показало (Феофилова, 1991), что содержание С 16:0 ниже в ножке (24,1 и 16,3% соответственно), однако ножка имеет более высоконенасыщенные липиды, чем шляпка.

Было проведено (Ratray, Wilkinson, 1988) сравнительное изучение жирнокислотного состава основных запасных липидов – триацилглицеринов с таковым основных липидов клеточной мембраны – фосфатидилхолином. Исследование показало, что, несмотря на то, что в обоих липидах обычно присутствуют одни и те же жирные кислоты, количество их заметно различается. Мембранные липиды, фосфолипиды более ненасыщенные, чем запасные липиды, триацилглицерины. В свою очередь, различные фракции фосфолипидов грибов характеризуются преобладанием тех или иных жирных кислот, в связи с чем степень их ненасыщенности может существенно

различаться. Как у высших, так и у низших грибов трудноокисляемыми фракциями, т.е. такими, в составе которых преобладают насыщенные жирные кислоты, являются лизофосфати-дилхолин, сфингомиелин и фосфатидилхолин, в то время как в составе фосфатидилинозита, фосфатидилсерина, фосфатидилэтанолamina, фосфатидилглицерина, кардиолипина и фосфатидной кислоты доминируют, как правило, ненасыщенные жирные кислоты, в связи с чем их можно отнести к легкоокисляемым (Бурлакова, Храпова, 1985; Феофилова и др., 1987).

Среди липидных соединений, редко встречающихся в грибах, выделяют алкильные и алкенильные эфиры. У некоторых видов грибов отмечено присутствие ряда не-обычных нейтральных липидов. Это диэфиры или 1-алкенил-эфиры двухатомных спиртов (например, этандиол, бутан-1-4-диол). Минорными, однако широко распространёнными компонентами грибов являются сфинголипиды, в частности цереброзиды и церамиды (Weet, 1980).

У многих исследованных видов базидиальных грибов обнаруживаются липофильные пигменты – каротиноиды, которые практически отсутствуют у низших грибов (Weet, 1980). Имеется сообщение о значительном содержании в грибах разнообразных по структуре терпеноидов (Losel, 1988).

Скрининг кислотрофных базидиомицетов – потенциальных продуцентов липидов

Скрининг проводили среди 48 штаммов 25 видов 20 родов, относящихся к порядкам *Polyporales*, *Agaricales* отдела *Basidiomycota*.

Проведенные исследования показали, что наиболее активным синтезом липидов обладают грибы пор. *Polyporales*. Однако способность к активному росту и синтезу липидов различна у представителей одного и того же рода и даже у штаммов одного вида. Проверенные штаммы видов грибов порядков *Polyporales*, *Agaricales* показали довольно широкую амплитуду колебаний по выходу биомассы (от 2 до 16 г/л) и содержанию в мицелии липидов (от 3 до 22% АСБ). Как видно из данных рис. 21 и 22, уровень биомассы и содержание липидов в мицелии исследуемых штаммов видов грибов р. *Ganoderma*

колебался в пределах 6,5-10 г/л и 4,7-10%, р. *Lentinus* – в пределах 4,5-11,5 г/л и 3,9-9,7%, р. *Trametes* – в пределах 6,9-13 г/л и 3,8-8,7%, рода *Laetiporus* – в пределах 5,7-10,2 г/л и 9,3-22% соответственно.

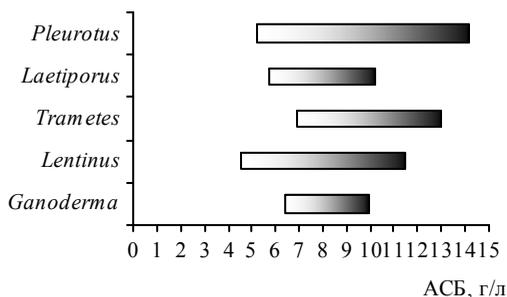


Рис. 21. Количество биомассы (г/л) представителей различных родов базидиальных грибов при глубинном культивировании на глюкозопептонной среде

Наиболее высоким содержанием липидов (10%) отличался штамм *G. lucidum* 1. Штаммы *L. edodes* 182 и *L. lepideus* 1 – представители рода *Lentinus* одинаково хорошо росли и накапливали биомассу, уровень общих липидов составил 7 и 9,7% соответственно. Среди грибов р. *Trametes* способность синтезировать повышенное количество липидов (6,1-9,7%) была присуща лишь видам *T. versicolor*, *T. zonatus*, *T. pubescens*, *T. pulverulentum*. Представители р. *Pleurotus*, отличаясь активным ростом (6-15 г/л), характеризовались сравнительно низкой липидпродуцирующей активностью. Содержание общих липидов в мицелии этих грибов не превышало 4-6% (рис. 22).

Показано, что наибольшей липидсинтезирующей способностью характеризовались виды р. *Laetiporus* – в частности штаммы *L. sulphureus*, несмотря на значительную их вариабельность по выходу биомассы (5,7-10,2 г/л) и синтезу липидов (9,3-22 %) (Гвоздкова и др., 2006). Именно среди них выявлены штаммы, способные к наиболее активному образованию липидов, что отмечено также другими исследователями (Капич и др., 1990).

Грибы *Daedaleopsis confragosa* и *Phanerochaete chrysosporium* (пор. *Polyporales*) отличались не только высоким выходом биомассы (11,6 и 15,7 г/л), но и повышенным синтезом липидов (7,7 и 10,6%) соответственно.

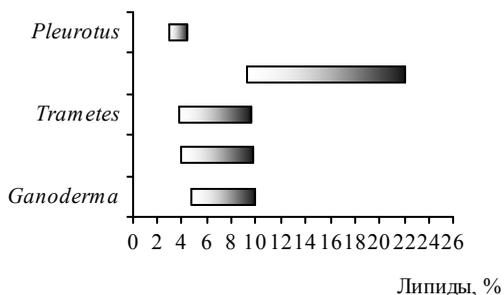


Рис. 22. Содержание липидов (% АСБ) в мицелии видов различных родов базидиальных грибов при глубинном культивировании на глюкозопептонной среде

Грибы родов *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Crinipellis* из порядка *Agaricales* характеризовались хорошим ростом и выходом биомассы (12-14 г/л), но накапливали незначительные количества липидов (не более 3-4,5%). По сравнению с ними *Hericium erinaceus* и *Stereum hirsutum* более активно синтезировали липиды (около 6%), в то же время выход биомассы у них был почти в 2 раза ниже.

Таким образом, среди исследованных культур высших базидиальных грибов истинных продуцентов липидов не выявлено, за исключением отдельных штаммов *L. sulphureus*, накапливающих в мицелии свыше 20-22% липидов. Повышенной способностью к синтезу липидов (7-22%) и активным ростом характеризовались отдельные представители пор. *Polyporales*. Содержание липидов в мицелии практически всех проверенных грибов порядка *Agaricales*, несмотря на активный рост, не превышало 3-5%.

Поскольку биологическая ценность липидов определяется их составом, скрининг продуцентов проводили с учетом содержания в них наиболее значимых в этом отношении компонентов – фосфолипидов, жирорастворимых

провитаминных соединений (эргостерин и каротиноиды) и жирных кислот.

Распределение грибов по способности к синтезу фосфолипидов различных видов родов отдела *Basidiomycota* представлено на рис. 23.

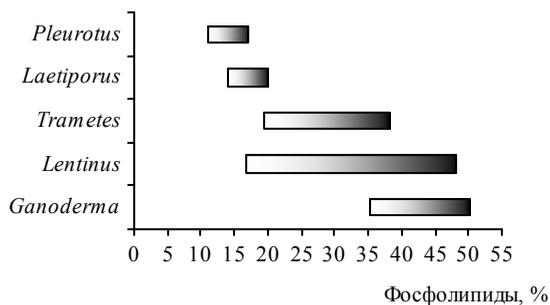


Рис. 23. Содержание фосфолипидов в составе липидов видов различных родов базидиальных грибов при глубинном культивировании на глюкозопептонной среде

Среди культур порядка *Polyporales* наиболее активным синтезом фосфолипидов характеризовались представители рода *Ganoderma*, удельное содержание которых в составе липидов варьировало в пределах 35-50%. Наибольшее количество фосфолипидов в составе липидов мицелия отмечено у штаммов *G. lucidum* 1 и 5.

Повышенное содержание фосфолипидов выявлено также в составе липидов видов родов *Lentinus* и *Trametes*. Можно выделить штаммы *L. edodes* 198 и 199, отличающиеся наиболее высоким содержанием в липидах фосфолипидов (41,8 и 48,2% соответственно).

Однако выход биомассы (5,5 и 5,8 г/л) и синтез липидов у этих культур были низкими (4,8 и 3,9% соответственно). Среди других представителей р. *Lentinus* можно отметить *L. lepideus* 1, который отличался не только сравнительно высоким содержанием в липидах фосфолипидов (38% или 3,7% АСБ), но и, по сравнению с другими штаммами, наиболее активным накоплением биомассы (9,5 г/л) и липидов (9,7%). Высокое содержание фосфолипидов в составе липидов мицелия

отмечено также у *T. pulverulentum* (38,3% или 3,3% АСБ). Однако, несмотря на повышенное содержание липидов (8,7%), *T. pulverulentum* не отличался активным накоплением биомассы. У грибов р. *Laetiporus* содержание фосфолипидов в составе липидов составило 14-20 %, хотя содержание их в мицелии было довольно высоким – свыше 5% АСБ, что сравнимо с *G. lucidum* 1.

Среди грибов р. *Pleurotus*, а также других, менее представленных родов (*Schizophyllum* и *Crinipellis*) пор. *Agaricales*, большинство проверенных культур, несмотря на высокий выход биомассы (7-14 г/л), характеризовалось не только низкой продуктивностью липидов (3-4,5%), но и фосфолипидов (11-17% липидов). Содержание фосфолипидов в мицелии большинства других грибов не превышало 1%, что типично для грибов этого порядка и согласуется с данными литературы (Капич и др., 1990).

Исследование липидного состава мицелиальных грибов различной систематической принадлежности показало, что в зависимости от родовой, видовой и внутривидовой принадлежности изучаемые грибы характеризуются значительной вариабельностью по содержанию фосфолипидов – от 13 до 50% состава липидов. Наиболее высоким содержанием фосфолипидов в мицелии и одновременно активным ростом и синтезом липидов характеризовались представители пор. *Polyporales* родов *Ganoderma*, *Lentinus*, *Trametes* и *Laetiporus* (рис. 23-25).

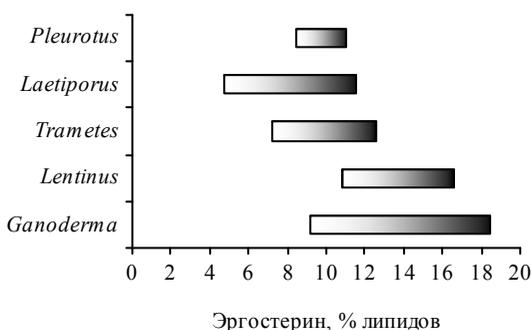


Рис. 24. Содержание эргостерина в составе липидов мицелия видов различных родов базидиальных грибов при глубинном культивировании на глюкозо-пептонной среде

К производным липидов относятся жирорастворимые витамины группы D. Эргостерин – основной стерин грибов – является предшественником витамина D. Именно поэтому в липидах отобранных грибов было изучено содержание этого ценного липофильного соединения. Больше всего эргостерина отмечено в грибах р. *Ganoderma*, меньше – в грибах рода *Pleurotus* (рис. 24).

Пищевая и фармакологическая ценность липидов определяется содержанием и сбалансированностью в них незаменимых полиненасыщенных жирных кислот. Исследование состава жирных кислот липидов у грибов показало, что они практически не содержат соединений с нечетным числом атомов углерода, а также разветвленных жирных кислот. Эти свойства выгодно отличают липиды базидиальных грибов от бактериальных, дрожжевых и некоторых продуцентов липидов микромицетов и приближают их по жирнокислотному составу к пищевым растительным маслам.

Качественный состав жирных кислот общих липидов высших мицелиальных грибов был сходен. В липидах мицелия присутствовали в основном жирные кислоты с длиной цепи от 14 до 18 атомов углерода, 60-80% суммы жирных кислот составляли ненасыщенные жирные кислоты (табл. 25). Характерной особенностью состава жирных кислот липидов практически всех исследованных грибов было высокое содержание линолевой кислоты (C18:2) – 55-70% и выше. Повышенной способностью к синтезу линолевой кислоты (более 70%) отличались штаммы *G. lucidum*, *L. edodes* 182, *L. sulphureus* 131, 205 и *A. biennis*, у которых отмечена и наибольшая степень ненасыщенности липидов.

Среди насыщенных жирных кислот наибольший удельный вес приходился на пальмитиновую кислоту (C16:0). Несколько большим содержанием пальмитиновой кислоты (15-23%) характеризовались липиды грибов порядка *Polyporales* (см. табл. 25).

Другие жирные кислоты в составе липидов (C12, C14 и C15), за исключение отдельных представителей, содержались в незначительном количестве и доля их не превышала 3-5% суммы всех кислот.

Таблица 25. Жирнокислотный состав липидов базидиальных грибов при глубинном культивировании на глюкозо-пептонной среде

Вид, штамм	Жирные кислоты, % суммы жирных кислот											
	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{15:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	СН	К _{ненас.}
Отдел <i>Basidiomycota</i>												
Порядок <i>Polyporales</i>												
<i>Ganoderma lucidum</i> 1	0,01	0,01	0,6	17,52	0,90	сл.	0,87	7,42	72,67	сл.	1,54	4,26
<i>G. lucidum</i> 5	0,24	0,01	0,83	14,17	1,48	2,99	1,41	7,75	71,12	сл.	1,52	4,09
<i>G. lucidum</i> IBK 1608	0,01	0,01	0,08	24,59	1,64	0,05	0,07	2,84	70,71	сл.	1,46	3,03
<i>G. lucidum</i> IBK 1787	0,21	0,05	1,55	16,48	1,58	1,71	0,71	6,71	71,6	сл.	1,52	3,83
<i>Lentinus edodes</i> 182	сл.	0,23	0,23	20,51	0,45	сл.	сл.	5,02	72,66	0,9	1,54	3,77
<i>L. edodes</i> 198	сл.	0,54	1,35	19,13	0,80	1,32	2,85	6,69	67,12	0,2	1,42	2,97
<i>L. edodes</i> 199	сл.	0,83	2,16	21,98	0,85	0,92	4,07	5,68	62,83	0,59	1,34	2,33
<i>L. edodes</i> IBK 506	-	0,91	1,58	21,45	1,33	0,78	2,65	5,35	65,20	0,75	1,39	2,65
<i>L. edodes</i> IBK 509	-	сл.	0,32	16,5	сл.	сл.	0,78	28,68	53,72	-	1,36	4,68
<i>L. tigrinus</i> 1	сл.	0,8	1,2	25,03	0,47	1,2	1,43	7,38	62,39	0,1	1,33	2,37
<i>Trametes hirsutus</i> 27		-	2,62	22,59	сл.	сл.	4,13	13,06	57,60	-	1,28	2,41
<i>T. hirsutus</i> IBK 1568	-	3,14	1,12	20,76	сл.	сл.	4,72	13,67	56,59	-	1,27	2,36
<i>T. versicolor</i> 1	сл.	8,23	3,03	16,2	2,96	0,23	2,36	11,02	55,97	-	1,26	2,33
<i>T. versicolor</i> IBK 1571	-	7,68	2,79	18,3	3,91	сл.	2,78	10,34	54,2	-	1,23	2,17
<i>T. zonatus</i> 1	0,02	2,11	3,05	18,20	3,08	0,07	2,23	10,35	60,89	-	1,35	2,89
<i>T. zonatus</i> IBK 1561	0,01	1,92	3,45	19,42	3,78	0,38	2,54	9,87	58,63	-	1,31	2,48
<i>T. pubescens</i> 1	0,02	0,01	3,57	27,11	-	0,4	5,02	7,49	61,3	-	1,30	2,2
<i>T. pubescens</i> IBK 322	0,02	0,02	3,70	24,91	сл.	0,42	4,32	6,85	59,76	-	1,26	1,99
<i>T. pulverulentum</i> 1	сл.	сл.	0,02	24,42	-	0,09	2,05	3,32	70,1	-	1,43	2,76
<i>Laetiporus sulphureus</i> 131	-	сл.	3,13	11,21	2,65	0,79	2,60	7,30	72,29	-	1,55	4,63
<i>L. sulphureus</i> 132	-	0,01	2,02	16,95	1,32	0,05	2,58	8,53	68,55	-	1,47	3,63

<i>L. sulphureus</i> 205	сл.	0,02	1,25	10,65	1,02	0,03	2,36	12,63	70,04	-	1,57	5,13
<i>L. sulphureus</i> 134	-	0,10	4,14	9,43	5,27	-	1,73	11,96	67,37	-	1,52	5,49
<i>L. sulphureus</i> 115	сл.	-	4,20	16,94	1,5	0,5	2,25	14,19	60,42	-	1,37	3,19
<i>L. sulphureus</i> 122	-	-	3,33	19,35	-	сл.	2,89	15,62	59,01	-	1,34	2,94
<i>L. sulphureus</i> IBK 1772	-	0,01	0,17	23,74	0,93	0,04	1,68	10,21	63,22	-	1,38	2,9
<i>L. sulphureus</i> IBK 1773	-	-	0,18	23,4	сл.	0,35	2,20	9,64	64,23	-	1,38	2,83
<i>Fomes fomentarius</i> 1	-	-	0,12	20,1	0,94	0,49	1,00	9,32	68,06	-	1,46	3,6
<i>Abortiporus biennis</i> 1	-	0,07	0,15	18,8	-	0,06	2,90	5,02	73	-	1,56	3,5
<i>Daedaleopsis confragosa</i> 1	0,09	-	0,37	19,5	-	3,91	0,74	11	64,39	-	1,4	3,06
<i>Climacodon septentrionalis</i> 1	0,01	0,01	1,48	20,32	-	1,19	2,32	10,2	64,47		1,39	2,95
<i>Tyromyces lacteus</i> 1	-	-	0,02	26,3	-	-	0,04	7,13	66,51	-	1,4	2,79
<i>Bjerkandera adusta</i> 1	-	-	0,49	22,42	-	2,55	0,23	10,01	64,3	-	1,39	2,89
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 1	-	-	0,02	20,37	0,01	-	-	25,23	54,37	-	1,34	3,9
Порядок Agaricales												
<i>Pleurotus ostreatus</i> 15	0,02	2,02	2,38	10,43	5,64	4,45	6,29	9,03	57,94	1,80	1,36	2,9
<i>P. ostreatus</i> 10	сл.	3,04	2,76	10	3,02	6,53	3,5	10,66	58,62	1,87	1,37	2,87
<i>P. ostreatus</i> 43	сл.	1,3	1,17	8,1	4,97	4,82	2,79	9,92	65,03	1,9	1,51	4,5
<i>P. ostreatus</i> 35	сл.	сл.	1,49	10,58	2,8	4,25	3,73	6,05	66,2	4,72	1,55	3,9
<i>P. ostreatus</i> 205	сл.	1,39	2,04	10,22	2,06	5,96	3,24	6,77	64,66	3,66	1,49	3,38
<i>P. ostreatus</i> 45	сл.	3,12	2,32	7,6	5,91	5,02	2,95	10	59,31	3,77	1,46	3,75
<i>P. ostreatus</i> 5	сл.	1,21	1,52	9,27	4,43	5,6	2,32	9,82	64,26	1,67	1,48	4,02
<i>Shizophyllum commune</i> 1	-	-	1,5	22,84	1,05	0,36	1,35	13,11	60,16	1,63	1,39	2,91
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	0,01	0,75	0,54	22,02	1,9	1,63	2,38	6,32	64,45	сл.	1,37	2,66
<i>Hericium erinaceus</i> 1	-	3,14	1,12	20,76	сл.	сл.	4,72	3,67	66,59		1,41	2,36
<i>Stereum hirsutum</i> 1	0,63	0,02	0,39	11,64	сл.	16,46	1,23	9,89	59,84	-	1,39	2,3

Таблица 26. Биохимический состав мицелия отобранных штаммов грибов

Показатель	<i>Ganoderma lucidum</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 205
АСБ, г/л	8-10	7,8-10
Сырой протеин, % АСБ	22-25	20,8-22
Липиды, % АСБ	8,5-10	22-23
Линолевая кислота, % суммы жирных кислот, % липидов	70-72	67,4-70
Фосфолипиды, % липидов	45-50	19-22
Эргостерин, % липидов	15-18,5	11-12
Полисахариды, % АСБ	9-10	4-4,6
Каротиноиды	-	11,7-12,5

На основании полученных результатов (синтез липидов, фосфолипидов, эргостерина, а также других ценных метаболитов) для дальнейшей работы были отобраны штаммы *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205. В табл. 26 приведен состав мицелия отобранных штаммов грибов.

Наши исследования показали, что *G. lucidum* 1 синтезирует не только уникальный комплекс липофильных соединений, но и значительное количество полисахаридов, что является основой использования этого штамма для создания новых функционально-корректирующих препаратов.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ЛИПИДОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Образование ценных метаболитов липидной природы зависит от условий культивирования продуцента и носит, как правило, штаммоспецифический характер. Химическая природа источников углерода и азота, их концентрация и соотношение оказывают существенное влияние на направленность процессов липогенеза. Утилизация сахара грибами зависит, в частности, от концентрации в среде азота. Соотношение C/N и общая сбалансированность компонентов среды определяют не

только интенсивность накопления биомассы, но и содержание в ней основных веществ белковой, липидной или углеводной природы.

С целью выявления потенциальных возможностей отобранных видов грибов изучено влияние разных по своей природе источников углеродного питания на их рост, синтез липидов и фосфолипидов, состав жирных кислот. Грибы выращивали на стандартной глюкозо-пептонной среде, в которой вместо глюкозы в качестве единственного источника углерода использовали сахарозу, лактозу, мальтозу, крахмал и мелассу в количестве, эквивалентном содержанию углерода в 3% глюкозы. Исследования показали, что отношение грибных культур к источникам углерода зависит от индивидуальных особенностей грибов.

Ganoderma lucidum 1 активно усваивает все источники углерода, однако не в равной степени. Наибольшее количество биомассы с высоким содержанием липидов и фосфолипидов отмечено при выращивании этого штамма на среде с лактозой (табл. 27).

Таблица 27. Влияние источников углерода на рост грибов и образование липидов

Вид, штамм	Источник углерода	Био-масса, г/л	Липиды, % АСБ	Фосфо-липиды, % липидов
<i>Ganoderma lucidum</i> 1	Глюкоза	11	10	50,4
	Лактоза	11,5	11,5	53,2
	Сахароза	8	6,9	47
	Крахмал	13	7,8	43
	Меласса	9,5	8	48,2
<i>Laetiporus sulphureus</i> 205	Глюкоза	10,5	22	20
	Мальтоза	8,7	20,5	18,3
	Сахароза	8	18	18,5
	Крахмал	12	23,5	21,9
	Меласса	10	20	15

Для *Laetiporus sulphureus* 205 лучшими для роста и синтеза липидов источниками углерода оказались глюкоза и крахмал

(см. табл. 27). На подобранных источниках углерода лучшим оказался и жирнокислотный состав липидов (табл. 28).

Для определения отношения исследуемых грибов к различным источникам азота использовали преимущественно органические, из неорганических – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaNO_3 , которые вносили в среду на фоне 0,2% кукурузного экстракта.

Наиболее благоприятными для роста *G. lucidum* 1, *L. sulphureus* 205 и синтеза ими липидов оказались органические формы азота, в частности пептон и дрожжевой экстракт, а также $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

На направленность процесса липогенеза большое влияние оказывает не только химическая природа источников углерода и азота, но и их количественное соотношение в питательной среде.

Таблица 28. Жирнокислотный состав липидов *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205 в процессе роста на питательных средах с благоприятными для липогенеза источниками углерода

Жирные кислоты,% суммы	<i>G. lucidum</i> 1		<i>L. sulphureus</i> 205	
	Глюкоза	Лактоза	Глюкоза	Крахмал
C _{14:0}	11,01	11	0,12	0,2
C _{15:0}	2,16	2,04	0,03	0,19
C _{16:0}	10,87	10,38	15,8	15
C _{17:0}	0,53	2,59	0,09	0,1
C _{18:0}	1,81	сл.	0,11	0,18
C _{18:1}	1,68	1,88	9,6	9,03
C _{18:2}	71,94	72,14	74,25	75,3
Σ ₁ ненасыщенных	73,62	73,99	83,88	84,33
Σ ₂ насыщенных	26,38	26,01	16,12	15,67
Σ ₁ / Σ ₂	2,8	2,8	5,2	5,4

Соотношение C/N в среде меняли за счет повышения содержания источника углерода (20-30-40 г/л), оставляя неизменной ее азотную составляющую. За счет этого отношение C/N возрастало с 11 до 23. Как видно из данных табл. 29-31, изменение отношения углерода и азота в среде культу-

вирования приводило не только к изменению содержания липидов, фосфолипидов, полисахаридов, но и к изменению спектра выявляемых жирных кислот и их соотношения. В большей степени эти изменения касались мажорных (высокий процент содержания) жирных кислот.

Наиболее благоприятным режимом, обеспечивающим одновременно высокий выход биомассы, липидов, фосфолипидов, а также эссенциальной линолевой кислоты и суммы ненасыщенных жирных кислот для *G. lucidum* 1, оказалось соотношение C/N = 17:1 (табл. 29).

Таблица 29. Влияние соотношения C/N на рост и липидогенез *Ganoderma lucidum* 1

Показатель	Соотношение C/N		
	11:1	17:1	23:1
Биомасса, г/л	9	12,7	11
Липиды, % АСБ	8	12,5	9,2
Фосфолипиды, % липидов	31,6	56	37,4
Экзополисахариды, г/л	5,4	7	7,6
Эндополисахариды, % АСБ	10,8	13,6	11,5
Жирные кислоты, % суммы			
C _{14:0}	сл.	0,09	0,07
C _{15:0}	0,46	0,31	0,88
C _{16:0}	13,87	9,93	17,81
C _{16:1}	1,18	1,15	0,99
C _{17:0}	сл.	0,2	0,24
C _{18:0}	5,98	0,47	0,49
C _{18:1}	2,23	7,21	11,5
C _{18:2}	74,28	80,64	68,51
Σ ₁ ненасыщенных	77,69	89	81
Σ ₂ насыщенных	22,31	11	19
Σ ₁ / Σ ₂	3,5	8,09	4,3

Несколько иной характер реагирования на изменение соотношения C/N в среде отмечен у *L. sulphureus* 205. Смещение

C/N в сторону увеличения концентрации источника углерода (с 11:1 до 23:1) приводило к повышению выхода биомассы (с 9 до 15 г/л). Самое высокое содержание липидов (26 %) отмечено при соотношении C/N = 17:1. При этом соотношении в липидах содержится до 25% фосфолипидов, в мицелии – до 13,7 мг/г каротиноидов, а также наблюдается самая высокая ненасыщенность липидов за счет возрастания C_{18:2} кислоты. Сумма ненасыщенных жирных кислот составила 87,49% (табл. 30).

Таблица 30. Влияние соотношения C/N на рост и *Laetiporus sulphureus* 205

Показатель	Соотношение C/N		
	11:1	17:1	23:1
Биомасса, г/л	7,86	13	15,4
Липиды, % АСБ	21,6	26	22,7
Фосфолипиды, % липидов	19,44	24,8	22,6
Каротиноиды, мг/г	11,82	13,7	11,54
Жирные кислоты, % суммы			
C _{15:0}	0,8	-	2,06
C _{16:0}	12,94	11,4	12,62
C _{17:0}	0,08	0,39	3,15
C _{18:0}	0,27	0,72	2,26
C _{18:1}	14,94	9,77	7,65
C _{18:2}	71,69	77,72	72,26
Σ ₁ ненасыщенных	86,63	87,49	79,91
Σ ₂ насыщенных	13,37	12,51	20,09
Σ ₁ / Σ ₂	6,48	6,99	4

Наиболее полноценными липиды оказались при соотношении C/N = 17:1. Фосфолипиды достигали 25,6%, содержание линолевой кислоты – 38,75%, сумма ненасыщенных жирных кислот – 75,24%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение соотношения C/N среды культивирования является важным фактором регуляции липогенеза и приводит к существенным сдвигам в жирнокислотной составляющей липидов мицелия грибов. Для исследованных нами грибов наиболее высокий выход биомассы с повышенным содержанием липидов и

фармакологически ценных метаболитов (фосфолипиды, линолевая кислота, полисахариды, каротиноиды) можно получить при соотношении С/Н = 17:1.

Проведенные исследования позволили подобрать оптимальные источники углеродного, азотного питания, лучшие их соотношения для роста грибов и синтеза ими липофильных соединений. За счет подбора образование липидов увеличилось на 18-25%, фосфолипидов – на 12-24%, линолевой кислоты – на 10-29% (табл. 31).

Таблица 31. Влияние оптимизации питательной среды на синтез липофильных соединений *Ganoderma lucidum* 1, *Laetiporus sulphureus* 205

Вид, штамм	Липиды, %			Фосфолипиды, % липидов			Линолевая кислота, % суммы жирных кислот		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>G. lucidum</i> 1	10	12,5	25	50	56	12	72,7	80	10
<i>L. sulphureus</i> 205	22	26	18	20	24,8	24	70	77,7	11

Примечания. 1 – содержание до оптимизации, 2 – после оптимизации, 3 – % увеличения.

Полученные результаты явились основой создания промышленных сред. Активное использование грибами лактозы, сахарозы и крахмала позволило использовать широкий круг субстратов для выращивания грибов. Наибольший интерес представляли вторичные ресурсы по переработке сельскохозяйственной продукции: молочная сыворотка, свекловичная меласса, крахмал, продукты мукомольной промышленности, которые являются источниками не только углеводов, но и белка.

Подбор промышленных питательных сред для культивирования *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205

При подборе промышленных сред было изучено влияние не только источников углерода, азота, их соотношений на липидогенез грибов, но и стимулирующих факторов, к которым

относятся растительные масла, подсолнечный и рапсовый шроты. Экзогенные липиды, включаемые в состав сред в виде индивидуальных жирных кислот, растительных масел, отходов маслоперерабатывающих производств, способны стимулировать рост, продукцию липидов, жирных кислот, каротиноидных пигментов, полисахаридов и др. При этом, как правило, липиды отражают состав жирных кислот не только синтезированных самим микроорганизмом, но и ассимилированных ими из компонентов среды.

Установлено, что различные растительные масла существенно отличаются по своему действию на рост грибов и их биосинтетическую активность.

Для *G. lucidum* 1 внесение в среду подсолнечного масла в концентрации 0,5% незначительно способствовало увеличению выхода биомассы, содержанию в мицелии липидов, фосфолипидов, полиеновых жирных кислот, а также несколько стимулировало синтез полисахаридов. Рапсовое масло способствовало росту и образованию липидов грибом в меньшей степени, чем подсолнечное. Липиды в этих условиях отличались более низкой степенью ненасыщенности.

Для *L. sulphureus* 205 лучшим экзогенным липидсодержащим компонентом оказалось подсолнечное масло в концентрации 0,5%, которое способствовало росту культуры, накоплению в мицелии липидов, каротиноидных пигментов, увеличению доли линолевой кислоты в составе жирных кислот. Применение масла в концентрации 1,0%, несмотря на активный рост гриба и более высокий выход общих липидов, приводило к снижению в мицелии количества каротиноидных пигментов, а в составе жирных кислот – доли линолевой кислоты. Внесение рапсового масла в среду культивирования снижало содержание каротиноидных пигментов в мицелии гриба по сравнению с подсолнечным маслом. Полученные результаты явились основанием для использования подсолнечного масла в количестве 0,5% в промышленной среде.

Подсолнечный и рапсовый шроты являются источником не только липидов, но и белка. Поэтому, не нарушая соотношение C/N в среде, пептон заменили на шрот и вносили в количестве, эквивалентном содержанию азота в пептоне среды. Наиболее благоприятным для активного роста гриба *G. lucidum* 1 и синтеза им липидов оказался подсолнечный шрот, добавление которого

в питательную среду способствовало увеличению выхода биомассы. Содержание же липидов, фосфолипидов, полисахаридов находилось практически на прежнем уровне. Не изменился и жирнокислотный состав липидов. Сумма ненасыщенных жирных кислот достигала 84-89%. Липиды гриба, выращенного в присутствии подсолнечного шрота, характеризовались повышенным содержанием линолевой кислоты (около 80% суммы жирных кислот).

Проведенные исследования показали, что при выращивании *G. lucidum* 1 подсолнечное масло в среде вполне можно заменить подсолнечным шротом – отходом маслоперерабатывающих производств и использовать его при разработке промышленных питательных сред.

При выращивании *L. sulphureus* 205 внесение в питательную среду подсолнечного шрота способствовало незначительному накоплению биомассы и каротиноидных пигментов. Подсолнечный и рапсовый шроты не оказывали влияния на липидогенез *L. sulphureus* 205.

Ранее нами было показано, что активное использование вышеуказанными видами лактозы, сахарозы и крахмала свидетельствует о возможности привлечения широкого круга субстратов для их выращивания с целью получения биомассы, обогащенной биологически ценными липид- и полисахаридсодержащими компонентами. Для выращивания *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 было испытано несколько вариантов сред, содержащих в качестве основных источников углерода и азота молочную сыворотку, мелассу, крахмал, ржаную муку, а также дешевые и недефицитные биостимуляторы, которые применяются в регламентных средах.

Основным критерием при подборе промышленных питательных сред был высокий выход биомассы с повышенным содержанием фармакологически ценных метаболитов: липидов, фосфолипидов, незаменимой линолевой кислоты, а также полисахаридов и каротиноидов.

G. lucidum 1, как активно использующий лактозу, выращивали на двух вариантах сред, содержащих в качестве основного источника углевода молочную сыворотку с добавлением в различных вариациях азотсодержащих рост- и липидстимулирующих добавок. При этом соотношение C/N в среде не превышало 17:1-19:1 как наиболее благоприятное для роста гриба и липидообразования.

Наиболее активное накопление биомассы, липидов, а также полисахаридов отмечено при выращивании гриба на среде, содержащей молочную сыворотку и подсолнечный шрот. Липиды в этих условиях характеризовались повышенным содержанием фосфолипидов и высокой степенью ненасыщенности за счет существенного преобладания в составе жирных кислот незаменимой линолевой кислоты.

При выращивании *L. sulphureus* 205 наилучшим источником углеродного питания, обеспечивающим активный рост, синтез липидов и каротиноидов, оказался крахмал. В качестве источника азота, заменяющего пептон и кукурузный экстракт стандартной полусинтетической среды, использовали сравнительно дешевую и недефицитную муку (ржаную либо пшеничную), которая наряду с белком и аминокислотами богата витаминами, жирами, минеральными элементами и др. веществами.

Исходя из этого, были предложены три варианта промышленных сред, содержащих в различных сочетаниях свекловичную мелассу, молочную сыворотку и подсолнечное масло. Лучшей оказалась среда, содержащая 2% молочной сыворотки, 3% мелассы и 0,5% подсолнечного масла.

Таким образом, на основании изучения физиологических потребностей исследуемых видов грибов определена возможность замены в питательных средах дефицитных и дорогостоящих компонентов на вторичные продукты переработки сельскохозяйственного сырья – молочную сыворотку, свекловичную мелассу, крахмал, а также продукты мукомольной и маслоперерабатывающей промышленности, которые составили основу промышленных сред.

Предлагаемые промышленные среды для культивирования исследуемых видов грибов:

G. lucidum 1 – молочная сыворотка 5%, подсолнечный шрот 0,7%, вода 1 л;

L. sulphureus 205 – ржаная мука 3%, крахмал 1%, вода 1 л.

На подобранных питательных средах грибы накапливают значительное количество биомассы и соединений липидной природы (табл. 32).

Таблица 32. Содержание биомассы и соединений липидной природы при культивировании *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205 на промышленных питательных средах

Показатель	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205
Биомасса, г/л	12-15	12-14
Липиды, % АСБ	11-13	25-26
Фосфолипиды, % АСБ	4,6-5	6-7
Фосфолипиды, % липидов	49,5-54	24-26
Экзополисахариды, г/л	5,6-6	-
Эндополисахариды, % АСБ	11,2-12,5	4-5
Каротиноиды, мг/г АСБ	-	12-13,7
C _{14:0}	0,62	0,32
C _{15:0}	0,17	0,04
C _{16:0}	17,27	14,36
C _{16:1}	0,25	0,02
C _{17:0}	0,11	0,12
C _{18:0}	0,63	0,19
C _{18:1}	4,67	9,84
C _{18:2}	76,22	75,11
C _{18:3}	0,06	-
Σ ₁ ненасыщенных	81,2	84,97
Σ ₂ насыщенных	18,8	15,03
Σ ₁ ненас. / Σ ₂ насыщ.	4,3	5,7

Оптимизация основных биотехнологических параметров (температура, рН среды, аэрация) для получения биомассы грибов с высоким содержанием липофильных компонентов

Температурный фактор, как известно, влияет не только на скорость роста и накопление биомассы, но и на скорость протекающих в клетках биосинтетических процессов, а в итоге и на состав синтезированных продуктов.

Изучено влияние различных температур культивирования (20-22; 26-28 и 30-32 °С) на рост, образование липидов и полисахаридов *G. lucidum* 1, *L. sulphureus* 205 на подобранных промышленных средах.

Наиболее оптимальной для роста и синтеза липофильных соединений грибом *G. lucidum* 1 оказалась температура 26-28 °С. Повышение и особенно снижение температуры культивирования приводило к ухудшению всех показателей, в т.ч. содержания полисахаридов (рис. 25, а).

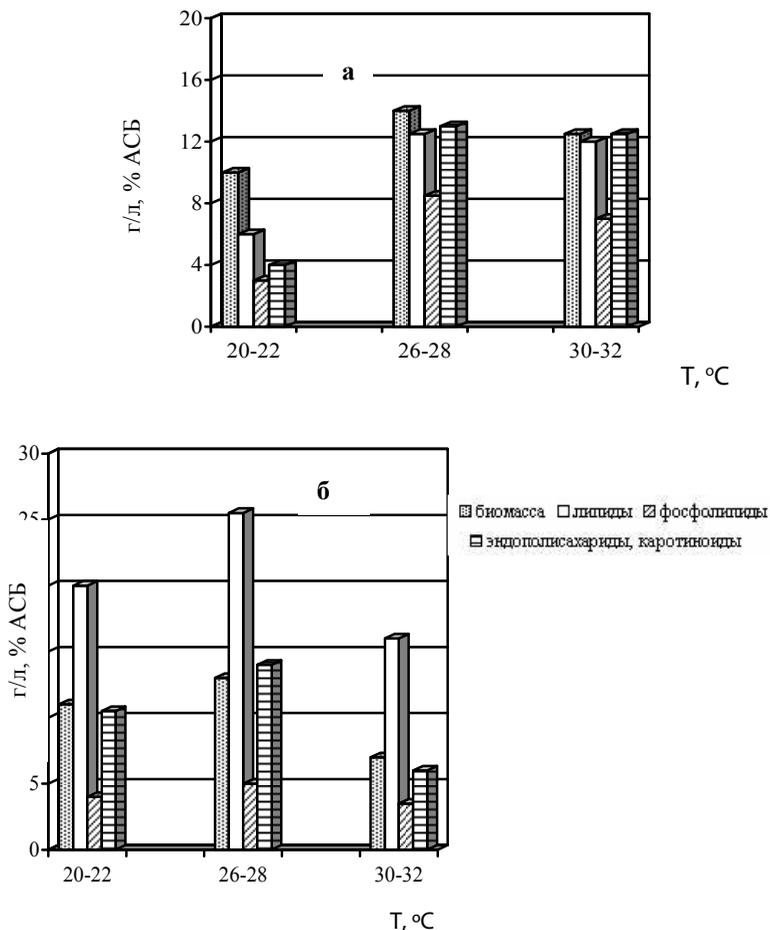


Рис. 25. Влияние температуры культивирования на рост и липидогенез грибов при глубинном культивировании на промышленных средах: а – *Ganoderma lucidum* 1; б – *Laetiporus sulphureus* 205.

Таблица 33. Влияние температуры культивирования на жирно-кислотный состав липидов *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205

Жирные кислоты, % суммы	<i>G. lucidum</i> 1			<i>L. sulphureus</i> 205		
	Температура, °С					
	20-22	26-28	30-32	20-22	26-28	30-32
C _{14:0}	1,14	1,48	1,54	0,20	0	0,22
C _{15:0}	0,79	0,43	1,98	0,18	0,20	0,26
C _{16:0}	12,57	12,92	15,0	15,13	12,02	18,40
C _{16:1}	0,51	0,36	2,92	0,14	0,12	0,06
C _{17:0}	2,48	1,16	2,31	0,50	0,37	0,23
C _{18:0}	1,13	0,82	3,15	1,14	0,89	0,66
C _{18:1}	5,04	3,76	7,79	12,06	9,22	16,01
C _{18:2}	76,18	77,67	65,08	70,52	76,98	63,94
C _{18:3}	0,16	1,40	0,24	0,13	0,20	0,22
Σ ₁ ненасыщ.	81,89	83,19	76,02	82,85	86,52	80,23
Σ ₂ насыщ.	18,18	16,81	23,98	17,15	13,48	19,77
Σ ₁ / Σ ₂	4,5	4,9	3,2	4,8	6,41	4,14

Изучение влияния температурного фактора на рост и процесс липидообразования *L. sulphureus* 205 показало, что у этого гриба, как и у *G. lucidum* 1, оптимальная температура для активного накопления биомассы, липидов, фосфолипидов и каротиноидов также находится в пределах 26-28 °С (рис. 25, б). Максимальное количество биомассы отмечено при 20-22 °С, липидов, фосфолипидов и полисахаридов – при 26-28 °С.

Анализ жирнокислотного состава липидов грибов позволил выявить следующие закономерности: у *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 с понижением температуры культивирования увеличивается степень ненасыщенности липидов. Это связано, очевидно, с усилением синтеза грибами эссенциальной линолевой кислоты (C_{18:2}) и снижением в составе липидов олеиновой (C_{18:1}) и насыщенной пальмитиновой (C_{16:0}) кислоты (табл. 33).

Проведенные исследования показали, что температурный режим может быть использован в качестве эффективного фактора регуляции не только синтеза, но и состава липидов.

Оптимальной для роста исследуемых базидиальных грибов оказалась температура 26-28 °С, которая совпадает с оптимумом температуры для синтеза полноценного комплекса липофильных соединений (табл. 33).

Важным фактором, определяющим рост микроорганизмов и их физиологическую активность, является рН среды. От уровня этого показателя зависит скорость поступления питательных веществ в клетку, активность ферментов и образование различных метаболитов, в т.ч. липидных. В литературе практически отсутствуют сведения о влиянии рН среды на биосинтез липидов базидиальными грибами. Влияние активной кислотности среды на рост и синтез липидов грибами было исследовано на подобранных промышленных средах в интервале рН 3-7,5. Исходное значение рН определялось после стерилизации среды.

Исследования, проведенные со штаммом *G. lucidum* 1, показали, что он растет в широком диапазоне начальных значений рН среды. Однако наиболее благоприятным для активного накопления биомассы, липидов, фосфолипидов и эндополисахаридов оказалось значение рН, равное 5,6. Сдвиг рН в сторону от оптимального значения приводил к незначительному снижению выхода биомассы и липидов (рис. 26).

Наиболее существенными были изменения в составе липидов. Так, при рН 4,2 уменьшалось относительное содержание фосфолипидной фракции: ее доля в липидах составила около 24 % или 1,74% АСБ, что в 2 раза меньше, чем при рН 5,6 (48,4% липидов или 4,2 % АСБ) и в 1,7 раза меньше, чем при рН 7,5 (41,6 % липидов или 3,4 % АСБ).

Анализ жирнокислотного состава липидов *G. lucidum* 1 показал, что в условиях кислой среды (рН 4,2) суммарное содержание насыщенных жирных кислот увеличилось в 1,5 раза по сравнению с рН 5,6 и в 1,6 раза по сравнению с рН 7,5 (табл. 34). При значении рН 4,2 в составе липидов гриба преобладала пальмитиновая (C_{16:0}) кислота, что обусловило и низкую степень (2,4) ненасыщенности липидов.

Среди ненасыщенных жирных кислот, независимо от рН среды, в составе липидов гриба преобладала линолевая кислота

(C_{18:2}). При снижении pH с 7,5 до 4,2 ее удельное содержание уменьшалось с 78,09 до 57,76% (табл. 34). В то же время содержание моноеновой олеиновой кислоты (C_{18:1}) повышалось. Подобные изменения в составе жирных кислот липидов при изменении pH среды культивирования характерны для различных микроорганизмов. Полагают, что увеличение насыщенности жирных кислот липидов в условиях кислой реакции среды влияет на текучесть цитоплазматической мембраны, которая в этих условиях становится более жесткой и менее проницаемой для водородных ионов, т.е. это своего рода проявление защитных механизмов клетки (Кейтс, 1975).

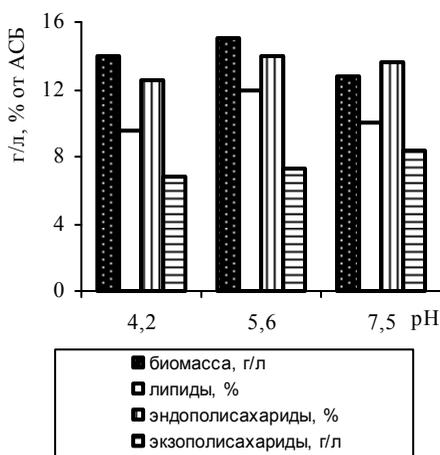


Рис. 26. Влияние pH среды на рост и липидогенез гриба *Ganoderma lucidum* 1

Как показали результаты исследования, pH среды значительно влияет на рост и синтез липидов *L. sulphureus* 205 (рис. 27). Для наиболее активного накопления биомассы оптимальным оказалось pH 3-3,5. Значение pH среды менее 2 отрицательно сказалось на росте культуры. Повышение pH среды до 5,6 привело к значительному (более чем в 2 раза) снижению выхода биомассы гриба. При pH среды 7 рост гриба практически полностью прекращался. С точки зрения прикладного аспекта ацидофильность *L. sulphureus* 205 на подобранной промышленной среде очень существенна.

Максимальное накопление липидов в мицелии *L. sulphureus* 205 (25,6%) наблюдалось при pH 3-3,5. Липогенная активность культуры существенно снижалась при pH 5,6 – содержание липидов снизилось до 12,8%, почти в 2 раза уменьшилось также содержание каротиноидов (рис. 27).

Таблица 34. Влияние pH среды на жирнокислотный состав липидов *Ganoderma lucidum* 1

Жирные кислоты, % суммы	pH среды		
	4,2	5,6	7,5
C _{14:0}	4,72	1,05	0,88
C _{15:0}	1,49	0,43	0,42
C _{16:0}	18,99	16,65	15,34
C _{16:1}	3,24	0,36	0,35
C _{17:0}	0,74	0,16	0,18
C _{18:0}	3,14	0,82	0,96
C _{18:1}	9,66	3,76	3,72
C _{18:2}	57,76	76,67	78,09
C _{18:3}	0,26	0,10	0,06
Σ ₁ ненасыщенных	70,92	80,89	82,22
Σ ₂ насыщенных	29,08	19,11	17,78
Σ ₁ ненас./Σ ₂ насыщ.	2,40	4,20	4,60

Значения pH среды 3-3,5 оказались наиболее благоприятными и для синтеза фосфолипидной фракции.

Анализ жирнокислотного состава липидов гриба показал, что при изменении pH среды от 5,6 до 3 сохраняется тенденция к увеличению степени ненасыщенности липидов в основном за счет более активного синтеза линолевой кислоты, доля которой в составе общих липидов составила 75,5-76% (табл. 35). Содержание олеиновой (C_{18:1}) и пальмитиновой (C_{16:0}) кислот при этом уменьшилось, что может быть связано с более выраженным в данных условиях процессом окислительного дегидрирования этих кислот.

В результате проведенных исследований установлено, что липогенез грибов в значительной степени определяется не только активной кислотностью среды, но и физиологическими особенностями самих продуцентов.

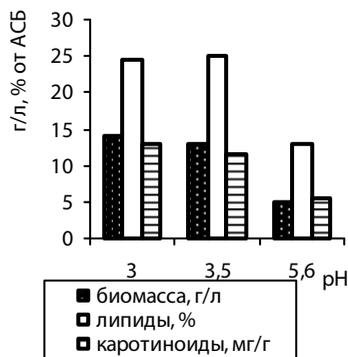


Рис. 27. Влияние pH среды на рост и липидогенез *Laetiporus sulphureus* 205

Таблица 35. Влияние pH среды на жирнокислотный состав липидов *Laetiporus sulphureus* 205

Жирные кислоты, % суммы	pH среды		
	3	3,5	5,6
C _{14:0}	0,2	0,29	0,37
C _{15:0}	0,18	0,05	0,1
C _{16:0}	12,13	14,6	15,59
C _{16:1}	0,14	0,68	0,07
C _{17:0}	0,5	0,29	0,37
C _{18:0}	1,14	0,56	0,84
C _{18:1}	10,06	7,32	11,62
C _{18:2}	75,52	76,03	70,87
C _{18:3}	0,13	0,18	0,17
Σ ₁ ненасыщенных	85,85	84,21	82,73
Σ ₂ насыщенных	14,15	15,79	17,27
Σ ₁ ненас. / Σ ₂ насыщ.	6,1	5,3	4,79

На процесс погруженного культивирования грибов большое влияние оказывают условия аэрации. Физиологическая активность и липогенез исследуемых видов грибов, выращенных на промышленных питательных средах, изучали при скорости растворения кислорода в среде (г O₂/л·ч): 0,55,

0,21, 0,155 и 0,115, что соответствует объемам среды (мл): 50, 150, 200 и 300, а также выращивая грибы в ферментерах.

Как видно из данных рис. 28, максимальная продуктивность по биомассе и липидам *G. lucidum* 1 отмечена при наиболее высокой интенсивности аэрации в среде (объем среды 50 мл, скорость растворения кислорода 0,55 г O₂/л·ч). Снижение аэрации до скорости растворения кислорода в среде 0,21 г O₂/л·ч вызывало некоторое уменьшение выхода биомассы (12,3 г/л) и липидов (12%). Изменение интенсивности аэрации оказывало существенное влияние и на синтез полисахаридов.

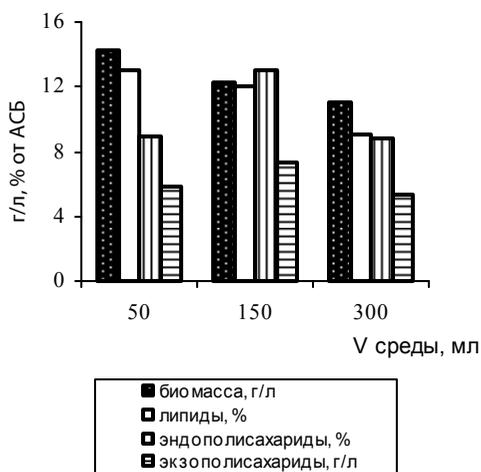


Рис. 28. Влияние интенсивности аэрации среды на рост и липидогенез *Ganoderma lucidum* 1

Наиболее высокое содержание экзо- и эндополисахаридов отмечено при скорости растворения кислорода 0,21 г O₂/л·ч (объем среды 150 мл) и достигало 7,3 г/л и 13%. При увеличении скорости растворения кислорода от 0,115 до 0,55 г O₂/л·ч (с 300 мл до 50 мл среды) в липидах *G. lucidum* 1 отмечалось некоторое понижение относительного содержания фосфолипидной фракции с 55,1 до 49,7 % (рис. 28).

Жирнокислотный состав липидов гриба со сменой режима аэрации претерпевал также незначительные колебания (табл. 36).

Таблица 36. **Жирнокислотный состав липидов *Ganoderma lucidum* 1 при различных условиях аэрации**

Жирные кислоты, % суммы	Скорость растворения кислорода, г O ₂ /л·ч		
	0,55	0,21	0,115
	Объем среды, мл.		
	50	150	300
C _{14:0}	1,69	0,85	5,27
C _{15:0}	1,57	0,63	1,3
C _{16:0}	16,49	14,65	17,59
C _{16:1}	0,54	0,36	0,54
C _{17:0}	0,6	0,36	0,31
C _{18:0}	3,54	0,62	2,69
C _{18:1}	4,73	3,76	11,19
C _{18:2}	70,84	78,67	60,85
C _{18:3}	сл.	0,1	0,26
Σ ₁ ненасыщ.	76,11	82,89	72,84
Σ ₂ насыщ.	23,89	17,11	27,16
Σ ₁ ненасыщ. / Σ ₂ насыщ.	3,2	4,8	2,7

С увеличением интенсивности аэрации с 300 до 150 мл среды наблюдалось значительное повышение суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот. Изменения в композиции жирных кислот липидов происходили в основном за счет существенного повышения ненасыщенной линолевой кислоты и снижения олеиновой и насыщенной пальмитиновой кислот (табл. 36).

Таким образом, для получения биомассы с максимальным содержанием липидов, фосфолипидов, эссенциальных жирных кислот, полисахаридов культивирование *G. lucidum* 1 следует проводить при скорости растворения кислорода 0,21 г O₂/л·ч. Несмотря на несколько меньшее количество биомассы и липидов, последние являются более ненасыщенными

(содержание эссенциальной линолевой кислоты достигает 78% суммы кислот) и с повышенным содержанием фосфолипидной фракции. Кроме того, указанные условия аэрации оказались наиболее благоприятными и для синтеза полисахаридов.

Исследования, проведенные с *L. sulphureus* 205, показали, что наиболее высокая продуктивность по выходу биомассы (15 г/л), липидам (около 26%), а также каротиноидам (12,8 мг/г) наблюдалась при скорости растворения кислорода 0,155 г O₂/л·ч или 200 мл среды (рис. 29).

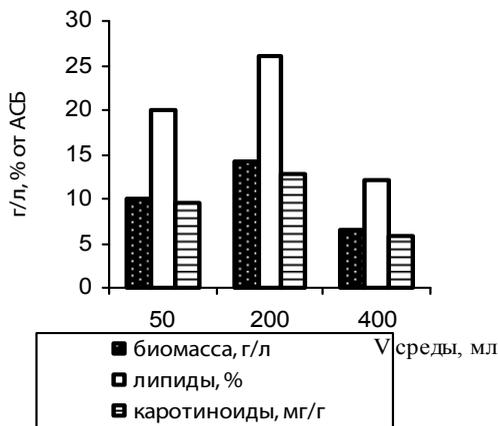


Рис. 29. Влияние интенсивности аэрации среды на рост и липидогенез *Laetiporus sulphureus* 205

Снижение интенсивности аэрации среды приводило к значительному уменьшению выхода биомассы, липидов и каротиноидов. В этих же условиях в составе липидов гриба отмечено и высокое содержание фосфолипидов.

Исследование жирнокислотного состава липидов показало лучшие результаты также при аэрации 0,155 г O₂/л·ч (табл. 37).

С увеличением интенсивности аэрации (объем среды с 200 до 50 мл) отмечена некоторая тенденция к уменьшению общей ненасыщенности липидов гриба за счет снижения содержания линолевой кислоты. Однако при различных режимах аэрации липиды характеризуются достаточно высоким содержанием суммы ненасыщенных жирных кислот (79,51-81,85%).

Таким образом, для обеспечения наиболее эффективного образования биомассы, липидов, фосфолипидов и каротиноидов культивирование *L. sulphureus* 205 целесообразно проводить при умеренной аэрации (скорость растворения кислорода 0,155 г О₂/л·ч).

Таблица 37. Жирнокислотный состав липидов *Laetiporus sulphureus* 205 при различных условиях аэрации

Жирные кислоты, % суммы	Скорость растворения кислорода, г О ₂ /л·ч		
	0,55	0,155	0,115
	Объем среды, мл.		
	50	200	300
C _{14:0}	0,83	0,20	0,11
C _{15:0}	0,25	0,18	0,05
C _{16:0}	18,24	16,13	18,17
C _{16:1}	0,1	0,14	0,02
C _{17:0}	0,35	0,5	0,16
C _{18:0}	0,82	1,14	0,39
C _{18:1}	12,66	8,06	10,58
C _{18:2}	66,55	73,52	70,35
C _{18:3}	0,2	0,13	0,17
Σ ₁ ненасыщенных	79,51	81,85	81,12
Σ ₂ насыщенных	20,49	18,15	18,88
Σ ₁ ненас. / Σ ₂ насыщ.	3,9	4,5	4,3

Температура, активная кислотность среды и аэрация являются основными факторами воздействия на липидогенез исследуемых видов грибов, с помощью которых можно регулировать биосинтез и состав липидов.

Изучение динамики накопления липидов и других биологически активных соединений

Грибы выращивали в ферментерах «Анкум-2М» (рабочий объем 10 л) на подобранных питательных средах.

Как следует из рис. 30, накопление биомассы, липидов, фосфолипидов и внутриклеточных полисахаридов *G. lucidum* 1 происходит параллельно, достигая максимума к 72-96 ч. Выход

биомассы составил 14,3-14,8 г/л, выход липидов – 13-14,5%, фосфолипидов – 8-9% АСБ. Содержание полисахаридов в период роста с 48 до 72 ч было практически постоянным и составило 12-13%.

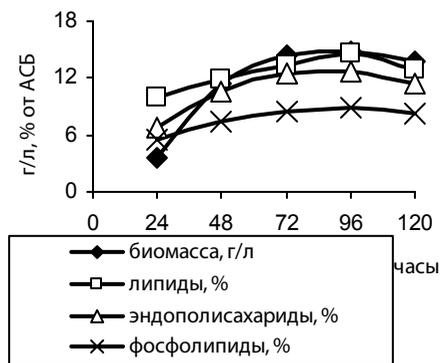


Рис. 30. Динамика роста и биосинтеза липидных компонентов *Ganoderma lucidum* 1 на оптимизированной питательной среде в ферментере

Таблица 38. Жирнокислотный состав липидов *Ganoderma lucidum* 1 в процессе роста на оптимизированной питательной среде в ферментере

Жирные кислоты, % суммы	Время культивирования, ч				
	24	48	72	96	120
C _{14:0}	1,1	1,46	1,52	1,61	2,12
C _{15:0}	0,2	0,39	0,43	0,61	0,72
C _{16:0}	20,12	11,98	10,64	9,73	21,12
C _{16:1}	сл.	2,8	0,86	сл.	0,4
C _{17:0}	сл.	0,41	0,35	0,32	0,11
C _{18:0}	0,77	0,91	1,15	1,15	1,2
C _{18:1}	7,13	8,1	8,33	6,92	4,79
C _{18:2}	70,18	77,56	78,91	80,81	71,14
Σ ₁ ненасыщенных	77,91	85,66	87,24	87,73	75,93
Σ ₂ насыщенных	22,09	14,34	12,76	12,27	24,07
Σ ₁ ненас./Σ ₂ насыщ.	3,5	6	6,8	7,2	3,1

Анализ жирнокислотного состава липидов показал, что рост гриба до 96 ч сопровождается повышением суммарной ненасыщенности общих липидов, что связано с увеличением в составе липидов фосфолипидной фракции и с усилением процессов дегидрирования насыщенных кислот, особенно пальмитиновой, и увеличением ненасыщенной линолевой кислоты (табл. 38). Дальнейший рост гриба приводит к уменьшению суммы ненасыщенных жирных кислот (с 87,73 до 75,93%).

Несколько иная закономерность прослеживается при выращивании *L. sulphureus* 205. Наибольшее количество биомассы (до 12,5-13,5 г/л) он накапливает к 120 ч. К этому же времени в мицелии содержится наибольшее (25-26%) количество липидов. Максимум фосфолипидов и каротиноидов наблюдается к 96 ч (рис. 31).

Исследование жирнокислотного состава липидной компоненты гриба показало, что в период интенсивного синтеза фосфолипидов (96 ч) липиды характеризуются наиболее высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, особенно линолевой кислоты (табл. 39). Отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к насыщенным изменялось от 4,5 до 8. Увеличение времени выращивания *L. sulphureus* 205 до 120 ч не влияло на жирнокислотный состав.

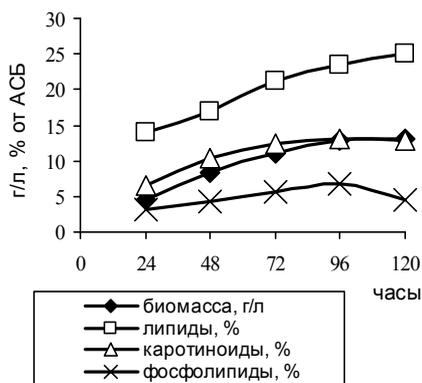


Рис. 31. Динамика роста и биосинтеза липидных компонентов *Laetiporus sulphureus* 205 на оптимизированной питательной среде в ферментере

Таблица 39. Жирнокислотный состав липидов *Laetiporus sulphureus* 205 в процессе роста на оптимизированной питательной среде в ферментере

Жирные кислоты, % суммы	Время культивирования, ч				
	24	48	72	96	120
C _{14:0}	0,1	0,5	0,12	сл.	сл.
C _{15:0}	0,15	0,64	0,16	0,16	сл.
C _{16:0}	15,8	15,54	11,29	9,68	10,33
C _{16:1}	1,48	1,42	1,18	0,09	сл.
C _{17:0}	0,37	0,35	0,22	0,39	0,48
C _{18:0}	1,6	0,8	0,76	0,93	2,23
C _{18:1}	18,3	19,99	20,69	10,24	15,97
C _{18:2}	59,34	59,68	64,92	77,78	70,25
C _{18:3}	0,96	1,08	0,66	0,73	0,74
Σ ₁ ненасыщенных	80,08	82,17	87,45	88,84	86,96
Σ ₂ насыщенных	17,92	17,83	12,55	11,16	13,04
Σ ₁ ненас./Σ ₂ насыщ.	4,5	4,6	7	8	7,2

Проведенные исследования показали, что фаза роста грибов определяет как количественное содержание липофильных соединений, так и их качественный состав. Максимальная продуктивность биосинтеза всех биологически активных соединений совпадает с началом стационарной фазы, что и определяет длительность выращивания грибов: *G. lucidum* 1 – 72-96 ч, *L. sulphureus* 205 – 96-120 ч.

Вопрос об использовании глубинного мицелия грибов как основы функционально-корректирующих препаратов в значительной мере связан с оценкой его биохимического состава, что в первую очередь определяется количеством и качеством содержащихся в биомассе ценных биологически активных соединений.

Данные биохимического состава, представленные в табл. 40, свидетельствуют о высоком содержании в мицелии исследуемых грибов фармакологически ценных биоактивных компонентов липидной и углеводной природы.

Особый интерес представляет липидная компонента, поскольку входящие в ее состав различные вещества – фосфолипиды, стерины, жирные кислоты, в т.ч. относящиеся к эссенциальным, являются биологически активными.

Таблица 40. Биохимический состав мицелия *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205

Показатель, % АСБ	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205
Липиды	10-13	24-26
Линолевая кислота, % липидов	70-83	70-78
Фосфолипиды	3,5-5,6	4,0-5,5
Эргостерин	1,4-1,6	1,2-1,5
Эндополисахариды	10-12	4-5
Сырой протеин	26-28	21-23
Фенольные соединения, мг%	1100-1150	2000-2500
Каротиноиды, мг/г АСБ	-	10-13

Липиды мицелия *G. lucidum* 1, составляющие 10-13%, характеризуются высоким содержанием фосфолипидной фракции, высокой степенью ненасыщенности, обусловленной повышенным содержанием эссенциальной линолевой кислоты и эргостерина. Содержание полисахаридов в мицелии гриба достигает 10-12%.

Отличительной особенностью *L. sulphureus* 205 является более высокое, по сравнению с *G. lucidum* 1, содержание в мицелии липидов – до 24-26%, что позволяет отнести этот гриб к истинным продуцентам липидов. На долю фосфолипидов в составе липидов приходится свыше 24-26%. Липиды *L. sulphureus* 205 отличаются повышенной степенью ненасыщенности, что связано с высоким удельным весом в составе жирных кислот эссенциальной линолевой кислоты. Содержание каротиноидных пигментов в мицелии гриба составляет 10-13 мг/г АСБ.

Содержание белка в мицелии исследованных видов грибов сравнительно невелико – в среднем 20-28%, что обусловлено условиями культивирования, благоприятствующими синтезу липидов и полисахаридов.

Повышенный уровень в составе мицелия грибов фенольных соединений (до 2500 мг%), полиеновых соединений – фосфолипидов, линолевой кислоты, а также каротиноидов обеспечивает также высокую антиокислительную активность спиртовых экстрактов мицелия изученных видов грибов (до 80-90% антиокислительной активности ионола).

Таким образом, наличие в составе мицелия исследованных видов грибов уникального комплекса биологически активных соединений липидной и углеводной природы, содержащихся в достаточно больших количествах, свидетельствует о его высокой биологической ценности. Биологически активные соединения, в т.ч. эссенциальные полиеновые жирные кислоты, фосфолипиды, провитаминные соединения, а также полисахариды имеют большое значение в жизнедеятельности организма человека и животных. Полученные результаты свидетельствуют о оозможности создания комплексных препаратов широкого спектра действия с функционально-корректирующими свойствами на основе биомассы глубинного мицелия как отдельных грибов-продуцентов, так и специально составленных композиций из них, взаимодополняющих и усиливающих действие друг друга.

ХАРАКТЕРИСТИКА СОЕДИНЕНИЙ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ: ФРАКЦИОННЫЙ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ

Выделение и фракционирование липидов. Качественный и количественный состав нейтральных липидов

Для последующего фракционирования, изучения качественного и количественного состава липиды выделяли из биомассы *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205, выращенных на разработанных для промышленного культивирования средах.

С целью разделения полярных и неполярных липидов на отдельные фракции применяются методики, основанные на различных физико-химических свойствах этих групп соединений (растворимость, способность взаимодействовать с адсорбентами и др.). Как известно, не существует одинаково эффективной методики разделения для липидов, выделенных из различных природных источников (Кейтс, 1975). Поэтому для выбора оптимального метода фракционирования липидов исследуемых видов грибов нами было проведено сравнительное исследование трех общепринятых методов разделения липидов: осаждение холодным ацетоном,

хроматография на колонке с силикагелем, противоточное разделение в системе гексан : этанол (87%).

Классическим методом отделения полярных липидов от нейтральных, в т.ч. от пигментов, является метод осаждения холодным ацетоном. Метод основан на том, что большинство фосфолипидов, в частности кислые фосфолипиды, не растворяются в холодном ацетоне, в то время как глицериды и другие нейтральные липиды хорошо растворяются в нем. Как правило, нерастворимый в ацетоне материал содержит не менее 95% липидного фосфора и лишь следы нейтральных липидов. Растворимая в ацетоне фракция в основном содержит все нейтральные липиды – глицериды, стеринны, эфиры стериннов, углеводороды и пигменты – и лишь следы фосфолипидов. Метод применяют для разделения липидов различных систематических групп грибов (Капич, Шишкина, 1993; Мысякина, Фунтикова, 2007), жировых смесей на основе молочной сыворотки (Шуваев и др., 2004), выделения фракции фосфолипидов из желтка яиц (Клебанов, 2001).

Осаждение холодным ацетоном позволило в достаточно полной мере отделить фосфолипиды от нейтральных липидов – во фракции нейтральных липидов осталось не более 7,8% фосфора (табл. 41).

Таблица 41. Фракционирование липидов грибов на основании растворимости в холодном ацетоне

Показатель, %	<i>Ganoderma lucidum</i> 1		<i>Laetiporus sulphureus</i> 205	
	Фракция			
	1	2	1	2
Доля фракции	62	38	72,6	27,4
Содержание фосфора во фракции	5,4	94,6	4	96
Фосфолипиды во фракции	6,5	96	5	84,15

Примечание. 1 – Нейтральная фракция, 2 – полярная.

Как видно из данных табл. 41, при разделении липидов на фракции полярных и нейтральных методом осаждения

холодным ацетоном у всех изучаемых грибов количественно преобладала фракция нейтральных липидов (62–72,6%). Подобная закономерность была отмечена ранее другими исследователями (Ratledger, Wilkinson, 1989) при изучении липидов плодовых тел ряда видов грибов. Фракция нейтральных липидов количественно преобладала у базидиомицета, вызывающего бурую гниль, *L. sulphureus* 205 (табл. 41). Напротив, наименьшее количество нейтральных липидов отмечено у дереворазрушающего гриба *G. lucidum* 1, вызывающего белую гниль древесины. Похожая закономерность состава липидов базидиомицетов различных физиологических групп была отмечена ранее А.Н. Капичем с соавт. (1990). Полярные липиды изученных видов грибов преимущественно образованы фосфолипидами (до 96%).

Хроматография липидов на колонке с силикагелем представляет собой эффективный метод разделения липидных смесей. Липидные соединения образуют с носителем водородные или ионные связи или связи, обусловленные действием вандервальсовых сил. Разделение липидных смесей происходит в соответствии с относительной полярностью их компонентов, которая определяется числом и типом полярных групп в молекуле, а также числом и типом неполярных или гидрофобных групп. Последовательное элюирование растворителями с возрастающей полярностью позволяет разделять липидные смеси в следующей последовательности: насыщенные и ненасыщенные углеводороды, воска, эфиры стеринов, триглицериды, свободные жирные кислоты, стерины, диглицериды, моноглицериды и т.д. Последовательным элюированием хлороформом, ацетоном, этанолом липиды *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 были разделены на три фракции (табл. 42).

Анализ содержания фосфора во фракциях показал, что данный метод мало пригоден для количественного разделения нейтральных и полярных липидов – до 65,8% фосфора перешло в хлороформенную фракцию (табл. 42). Однако спиртовая фракция *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 на 92–96% состояла из фосфолипидов, что позволяет предложить метод хроматографии на колонке с силикагелем в качестве простой и эффективной технологии фракционирования отдельных фосфолипидов грибов.

Эффективным и технологически несложным методом разделения смесей липидов является распределение веществ между несмешивающимися растворителями – противоточное распределение. Принцип метода заключается в распределении компонентов смеси между несколькими несмешивающимися растворителями.

Для разделения липидов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 на фракцию нейтральных и полярных липидов использовали гексан и этанол (87%). При этом полярные липиды переходят в этанол, а нейтральные остаются растворенными в гексане.

Таблица 42. Фракционирование липидов грибов методом хроматографии на колонке с силикагелем

Показатель, %	<i>Ganoderma lucidum</i> 1			<i>Laetiporus sulphureus</i> 205		
	Фракция					
	1	2	3	1	2	3
Содержание фосфора во фракции	34,6	18,2	47,2	65,8	21,2	13
Фосфолипиды во фракции	25,9	74,4	96,8	24,2	30	93

Примечание. 1 – Хлороформенная фракция, 2 – ацетоновая; 3 – спиртовая фракция.

Как известно (Кейтс, 1975), основным ограничением данного метода разделения является образование ассоциатов между сильно полярными липидами различной степени полярности. Вероятно, по этой причине у базидиомицетов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 доля неполярной фракции оказалась значительно меньше (20%), чем при осаждении ФЛ холодным ацетоном (55-70%).

Проведенные исследования показали, что метод осаждения холодным ацетоном является наиболее оптимальным для разделения нейтральных и полярных липидов изучаемых грибов.

Был изучен жирнокислотный состав фракций нейтральных и полярных липидов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205, полученных методом осаждения холодным ацетоном (табл. 43).

Для обоих изученных видов грибов отмечены общие закономерности – как в нейтральных, так и в полярных липидах ненасыщенные жирные кислоты количественно преобладают над насыщенными; во фракциях полярных липидов содержится больше ненасыщенных жирных кислот, чем во фракции нейтральных липидов (табл. 43).

Таблица 43. Жирнокислотный состав липидных фракций *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205

Жирная кислота, % суммы	<i>G. lucidum</i> 1		<i>L. sulphureus</i> 205	
	Фракция			
	нейтральная	полярная	нейтральная	полярная
C _{15:0}	6,54	4,84	-	0,24
C _{16:0}	24,93	15,6	46,15	17,62
C _{16:1}	3,74	2,43	1,51	сл.
C _{17:0}	1,97	0,89	1,18	0,84
C _{18:0}	3,78	0,69	2,25	2,48
C _{18:1}	11,32	4,11	18,94	15,66
C _{18:2}	47,72	71,42	29,35	62,7
C _{18:3}	-	-	0,62	0,46
Σ ₁ ненасыщ.	62,78	77,96	50,42	78,82
Σ ₂ насыщ.	37,22	22,04	49,58	21,18
Σ ₁ /Σ ₂	1,7	3,5	1,02	3,72

Большую степень ненасыщенности полярных липидов (фосфолипидов) отмечают в своих исследованиях и другие авторы (Капич, Шишкина, 1993).

В составе жирных кислот полярных и нейтральных фракций липидов грибов отмечаются также специфические различия. Так, для нейтральных и полярных липидов *G. lucidum* 1 характерно значительное преобладание диеновой C_{18:2} кислоты (табл. 43). У *L. sulphureus* 205 C_{18:2} кислота преобладает только в полярных липидах. В нейтральных липидах этого вида гриба в наибольшем количестве представлена C_{16:0} кислота. Для *L. sulphureus* 205 характерно еще и наличие полиненасыщенной C_{18:3} линоленовой кислоты.

Для изучения фракционного состава нейтральных липидов применяли метод тонкослойной хроматографии (рис. 32, 33).

В качестве метчиков использовали эргостерин, линолевую кислоту и рафинированное подсолнечное масло, которое на 94-96% состоит из смеси триглицеридов высших жирных кислот.

Исследования показали, что в составе нейтральных липидов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 содержится широкий спектр соединений: моно-, ди и триацилглицерины, стерины, свободные жирные кислоты, воска и эфиры стеринов.

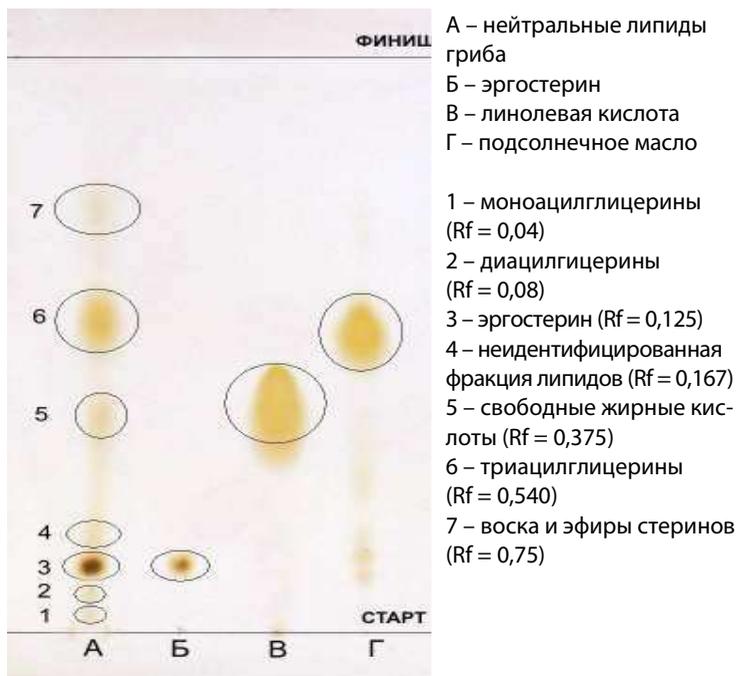


Рис. 32. Тонкослойная хроматография нейтральных липидов *Ganoderma lucidum* 1 на пластинах Silufol UV-254 в системе гексан : диэтиловых эфир : этанол = 70:30:1

Перешедший в нейтральную фракцию оранжевый пигмент *L. sulphureus* 205 в системе растворителей гексан: диэтиловых эфир:этанол (70:30:1) имел Rf = 0,058 (рис. 33).

У всех изученных грибов непосредственно над эргостерином находится пятно с Rf = 0,167, ярко светящееся в ультрафиолетовом свете. При разделении нейтральных липи-

дов плодовых тел *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus* и *Pleurotus ostreatus* в аналогичной системе растворителей Е.П. Феофилова с соавт. (1998) в этом положении также обнаружили «неидентифицированную фракцию липидов». Исходя из величины Rf и последовательности разделения соединений в данной системе растворителей, можно предположить стероидную природу этого соединения.

А – нейтральные липиды гриба
 Б – эргостерин
 В – линолевая кислота
 Г – подсолнечное масло

1 – неидентифицированная пигментированная фракция (Rf = 0,058)
 2 – эргостерин (Rf = 0,125)
 3 – неидентифицированная фракция липидов (Rf = 0,167)
 4 – свободные жирные кислоты (Rf = 0,375)
 5 – триацилглицерины (Rf = 0,540)
 6 – воска и эфиры стерина (Rf = 0,75)

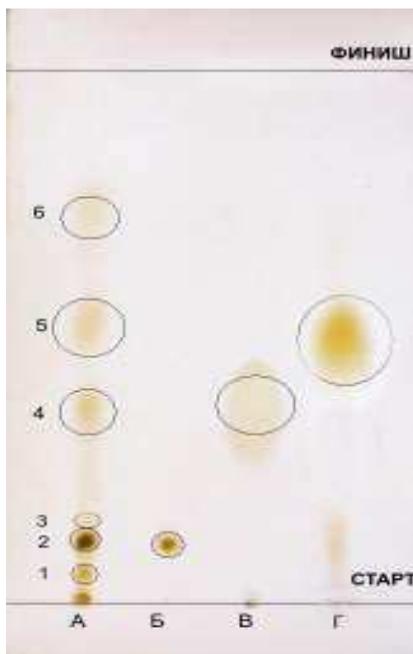


Рис. 33. Тонкослойная хроматография нейтральных липидов *Laetiporus sulphureus* 205 на пластинках Silufol UV-254 в системе гексан:диэтиловых эфир:этанол = 70:30:1

Если качественно состав нейтральных липидов изученных грибов отличался незначительно, то в количественном отношении нейтральные липиды грибов имели свои особенности (табл. 44).

В мицелии обоих изученных видов грибов в значительном количестве содержится эргостерин – биологически активное и фармакологически ценное соединение, являющееся провита-

мином витамина группы D (эргокальциферола). По содержанию эргостерина *G. lucidum* 1 в 1,7 раза превосходил *L. sulphureus* 205.

У изученных грибов в составе нейтральных липидов в большом количестве присутствуют резервные липиды – триацилглицерины, что характерно для большинства видов грибов разных систематических групп (Капич и др., 1989; Соловьева, 1997).

Таблица 44. Состав нейтральных липидов глубинного мицелия *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205, % липидов

Фракция	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205
Неидентифицированная пигментированная фракция + диацилглицерины	-	20,5
Диацилглицерины	4,6	-
Эргостерин	14,8	8,5
Неидентифицированная фракция липидов (Rf = 0,167)	6,9	14,9
Свободные жирные кислоты	15,4	13,6
Триацилглицерины	42,4	25,8
Воска и эфиры стеринов	16	16,7

Триацилглицерины также играют важную роль в живом организме, являясь формой хранения жирных кислот, поступающих в дальнейшие метаболические превращения (Тюкавкина, Бауков, 1991). В мицелии *G. lucidum* 1 они составляли 42,2%. Что касается *L. sulphureus* 205, то содержание триацилглицеринов в составе его липидов было меньше – лишь 25,8% (табл. 44).

Содержание эргостерина во фракции нейтральных липидов исследуемых грибов также было определено по Либрману-Бурхарду (Проскуряков и др., 1938). Результаты практически не отличались от данных, полученных весовым методом. Так, содержание эргостерина и триацилглицеринов в нейтральных липидах у *G. lucidum* 1 составляло 13 и 44,1%, а у *L. sulphureus* 205 – 7,8% и 23% соответственно. Для базидиальных грибов

характерно высокое содержание восков и эфиров стеринов (до 16,7% у *L. sulphureus* 205).

Количественное содержание диацилглицеринов в липидах *L. sulphureus* 205 определить не удалось, поскольку в процессе хроматографирования они не отделились от пигмента. У *G. lucidum* 1 диацилглицерины относились к минорным соединениям и количественно составляли 4,6%.

В наибольшем количестве неидентифицированное соединение, флюоресцирующее в УФ свете, присутствовало в липидах *L. sulphureus* 205 (14,9%).

На хроматограммах нейтральных липидов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 четко видны интенсивно окрашенные пятна с Rf, равным таковому свободных жирных кислот (метчик В). Содержание свободных жирных кислот у грибов отличалось незначительно и находилось в пределах 12,6-15,4%. Присутствие свободных жирных кислот в составе липидов грибов в последние годы активно обсуждается в научной литературе. Значительное содержание (до 22% нейтральных липидов) свободных жирных кислот в составе липидов плодовых тел базидиомицетов *L. edodes*, *A. bisporus* и *P. ostreatus* также отмечают Е.П. Феофилова с соавт. (1998). Другие авторы (Паронян, 1969) считают, что для грибов не характерно высокое содержание свободных жирных кислот и, вероятнее всего, они образуются в результате частичного гидролиза и окисления триацилглицеринов при выделении и хранении липидов.

Был изучен жирнокислотный состав фракций свободных жирных кислот и триацилглицеринов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 (табл. 45, 46). В их фракциях присутствовали все кислоты, обнаруживаемые в составе нейтральных липидов соответствующих видов грибов (табл. 45).

В пуле свободных жирных кислот изученных видов грибов в наибольшем количестве представлены пальмитиновая C_{16:0}, стеариновая C_{18:0}, олеиновая C_{18:1} и линолевая C_{18:2} кислоты. У *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 отмечено преобладание C_{16:0} кислоты (табл. 45).

В составе триацилглицеринов *G. lucidum* 1, как и в пуле свободных жирных кислот, преимущественно содержатся пальмитиновая C_{16:0}, стеариновая C_{18:0}, олеиновая C_{18:1} и

линолевая C_{18:2} кислоты. У *G. lucidum* 1 линолевая C_{18:2} кислота преобладает только в триацилглицеринах (табл. 46).

Таблица 45. Жирнокислотный состав фракции свободных жирных кислот липидов *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205

Жирная кислота, % суммы	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205
C _{14:0}	1,88	-
C _{15:0}	0,78	-
C _{16:0}	39,99	51,47
C _{16:1}	0,77	сл.
C _{17:0}	0,61	4,39
C _{18:0}	6,28	13,95
C _{18:1}	20,76	17,14
C _{18:2}	28,93	13,05
Σ ₁ ненасыщ.	50,46	30,19
Σ ₂ насыщ.	49,54	69,81
Σ ₁ /Σ ₂	1,01	0,43
К ненасыщ.	0,79	0,43

Таблица 46. Жирнокислотный состав триацилглицеринов *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205

Жирная кислота, % суммы	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205
C _{14:0}	1,25	19,82
C _{15:0}	сл.	18,02
C _{16:0}	17,82	43,1
C _{16:1}	0,24	-
C _{17:0}	0,18	6,98
C _{18:0}	2,43	1,62
C _{18:1}	19,38	5,9
C _{18:2}	58,7	4,55
Σ ₁ ненасыщ.	78,32	10,45
Σ ₂ насыщ.	21,68	89,55
Σ ₁ /Σ ₂	3,61	0,12
К ненасыщ.	1,37	0,15

В составе триацилглицеринов *L. sulphureus* 205 в наибольшем количестве представлена пальмитиновая C_{16:0} кислота. C_{14:0} и C_{15:0} кислоты, не обнаруживаемые в пуле свободных жирных кислот, в триацилглицеринах составляют 19,82 и 18,02 % соответственно (табл. 46).

Сравнительный качественный и количественный анализ жирнокислотного состава фракций свободных жирных кислот и триацилглицеринов указывает на их значительное сходство. При этом преобладание разных кислот (пальмитиновой и линолевой) в двух фракциях у *G. lucidum* 1, а также появление в триацилглицеринах *L. sulphureus* 205 C_{14:0} и C_{15:0} кислот, не характерных для фракции свободных жирных кислот, ставят под сомнение предположение о том, что свободные жирные кислоты являются артефактами и образуются в процессе выделения липидов.

Проведенные исследования показали, что в составе фракции нейтральных липидов глубинного мицелия *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 содержатся многие биологически ценные липидные соединения. Наличие жирных кислот с высокой степенью ненасыщенности и высоким содержанием эссенциальной диеновой линолевой кислоты указывает на перспективность использования биомассы изучаемых грибов в составе функциональных продуктов.

Фракционный и жирнокислотный состав полярных (структурных) липидов

Полярные липиды, преимущественно образованные фосфолипидами, являются важнейшими структурными элементами клеточных мембран, которые во многом определяют их функциональные свойства. Изменения состава фосфолипидов, их упорядоченности и упаковки в бислое играют важнейшую роль в процессах адаптации клеток к окружающим условиям. Фосфолипиды грибов уже давно привлекают внимание исследователей (Феофилова, 1990). Установлено, что качественный состав фосфолипидов, как правило, сходен у грибов различных групп, а количественное соотношение фракций фосфолипидов является во многом видоспецифичным (Капич, Шишкина, 1993).

Нами был изучен фракционный состав полярных липидов глубинного мицелия *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205, которые, как было показано ранее, на 84-98% состоят из фосфолипидов. Изученные грибы имели похожий качественный состав полярных липидов. Преобладали следующие фракции: лизофосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, кардиолипин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидная кислота (рис. 34, 35).

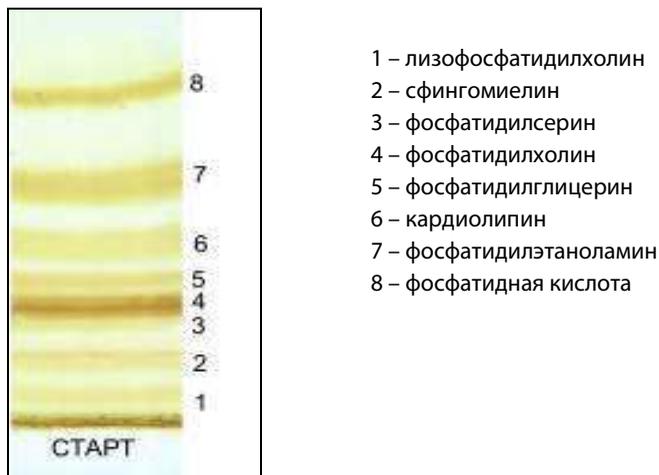


Рис. 34. Тонкослойная хроматография полярных липидов *Ganoderma lucidum* 1 на пластинах силикагель 60 F₂₅₄ в системе хлороформ : метанол : вода (65:25:4)

При разделении полярных липидов гриба *L. sulphureus* 205 обнаружено еще две пигментированные фракции (пигмент 1 и пигмент 2), расположенные за фосфатидной кислотой (рис. 35).

Определение количественного содержания отдельных фракций показало, что в составе полярных липидов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 в наибольшем количестве содержатся фосфатидилхолин (15,2-29,4%), фосфатидилэтаноламин (13,4-21,7%) и кардиолипин (13-13,9%). На преобладание в составе фосфолипидов грибов большинства систематических групп фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina и кардиолипина

указывают также исследования других авторов (Феофилова, 1990; Терешина, 2008).

- 1 – лизофосфатидилхолин
- 2 – сфингомиелин
- 3 – фосфатидилсерин
- 4 – фосфатидилхолин
- 5 – фосфатидилглицерин
- 6 – кардиолипин
- 7 – фосфатидилэтаноламин
- 8 – фосфатидная кислота
- 9 – пигмент 1
- 10 – пигмент 2



Рис. 35. Тонкослойная хроматография полярных липидов *Laetiporus sulphureus* 205 на пластинах силикагель 60 F₂₅₄ в системе хлороформ : метанол : вода (65:25:4)

Таблица 47. Состав полярных липидов глубинного мицелия *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205, % суммы полярных липидов

Фракция, %	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205
Лизофосфатидилхолин	11,6	8,7
Сфингомиелин	5,3	11,3
Фосфатидилсерин	9,7	10,9
Фосфатидилхолин	29,4	15,2
Фосфатидилглицерин	7,4	7
Кардиолипин	13,9	13
Фосфатидилэтаноламин	13,4	21,7
Фосфатидная кислота	9,2	12,2

Высокое содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina у базидиальных грибов отмечено также в исследованиях А.Н. Капича с соавт.(1989, 1990). При этом у *G. lucidum* 1 преобладал фосфатидилхолин, а у *L. sulphureus* 205 – фосфатидилэтанолamin (табл. 47).

Для *G. lucidum* 1 кроме названных выше соединений характерно значительное содержание лизофосфатидилхолина (11,6%) (табл. 47). *L. sulphureus* 205 отличался более высоким по сравнению с *G. lucidum* 1 содержанием фосфатидной кислоты (12,2%) и сфингомиелина (11,3%).

Изученные виды базидиальных лекарственных грибов, обладая в основном типичным набором фракций фосфолипидов, могут существенно различаться по их относительному содержанию.

Рассматривая состав полярных липидов изучаемых грибов с точки зрения создания функциональных препаратов, можно отметить их высокую фармакологическую ценность: фосфатидилхолин (лецитин) (рис. 36) является важной составной частью клеточных мембран и участвует в процессах метаболизма жиров в печени, значительно ускоряет ее восстановление при токсическом воздействии, замедляет фиброз и жировую инфильтрацию ткани печени, увеличивает синтез клетками РНК и белка, ускоряет регенерацию. В присутствии витамина В5 (пантотеновой кислоты) фосфатидилхолин превращается в ацетилхолин – один из наиболее распространённых в мозге нейромедиаторов. Ацетилхолин активизирует и ускоряет интеллектуальную деятельность человека, его работоспособность, способствует формированию и сохранению памяти.

Фосфатидилэтанолamin – один из фосфолипидов мозга, который играет жизненно важную роль в функционировании мембран нервных клеток. Кардиолипин является компонентом внутренней мембраны митохондрий. В отличие от других фосфолипидов, он обладает выраженными иммунными свойствами.

Различные фракции фосфолипидов характеризуются преобладанием тех или иных жирных кислот, в связи с чем степень их ненасыщенности может существенно различаться.

Как известно (Евстигнеева, 1983), фосфатидил-холины (рис. 36) содержат обычный для нейтральных жиров набор жирных кислот. С гидроксилом альфа углерод-ного атома связаны преимущественно предельные жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая), а с бета углеродым атомом – непредельные (олеиновая, линоленовая).

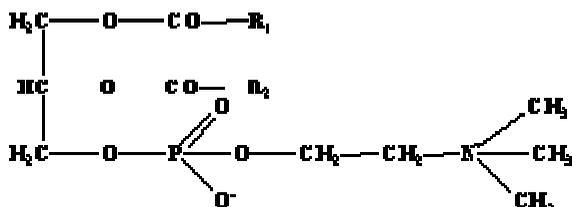


Рис. 36. Структурная формула фосфатидилхолина

Фосфатидилэтанол амины – соединения, где R_1 – обычно ацил насыщеннй, а R_2 – ненасыщеннй кислоты с 16-24 атомами С в цепи (рис. 37) (Евстигнеева, 1983).

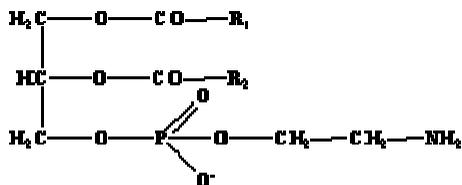


Рис. 37. Структурная формула фосфатидилэтанол амина

Кардиолипин – соединение, в котором две молекулы фосфатидной кислоты связаны с помощью одной молекулы глицерина (рис. 38).

Исследование жирнокислотного состава трех массивных фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтанол амина и кардиолипина) изучаемых грибов показало, что основной кислотой в них является пальмитиновая ($\text{C}_{16:0}$), присутствуют также стеариновая ($\text{C}_{18:0}$), олеиновая ($\text{C}_{18:1}$) и линолевая ($\text{C}_{18:2}$), а в кардиолипине – еще и $\text{C}_{16:1}$ и $\text{C}_{17:0}$ кислоты (табл. 48). Такие же результаты получены В.М. Тершиной (2008) для мембранных липидов гриба *Aspergillus niger*.

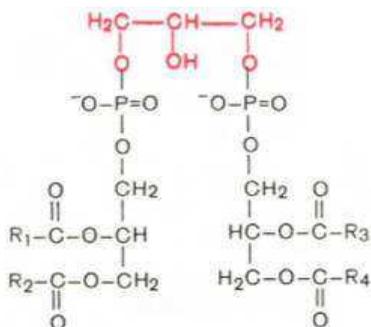


Рис. 38. Структурная формула кардиолипина

Таблица 48. Жирнокислотный состав фосфолипидной фракции *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205

Жирная кислота, % суммы	<i>G. lucidum</i> 1			<i>L. sulphureus</i> 205		
	1	2	3	1	2	3
C _{16:0}	38,5	66,96	41,1	46,28	72,14	44,93
C _{16:1}	-	-	-	-	-	6,28
C _{17:0}	-	-	5,89	-	-	1,82
C _{18:0}	3,49	6,21	2,85	8,13	2,51	2,98
C _{18:1}	19,88	9,98	16,17	19,6	11,56	20,23
C _{18:2}	38,13	16,85	33,99	25,99	13,79	23,76
Σ ₁ ненасыщ.	58,01	26,83	50,16	45,59	25,35	50,24
Σ ₂ насыщ.	41,99	73,17	49,84	54,41	74,65	49,73
Σ ₁ /Σ ₂	1,38	0,37	1	0,84	0,34	1,01
К ненасыщ.	0,97	0,44	0,84	0,72	0,39	0,74

Примечание. 1 – Фосфатидилхолин, 2 – фосфатидилэтаноламин; 3 – кардиолипин.

Для фосфоатидилэтаноламинов изучаемых видов грибов характерно выраженное преобладание насыщенных жирных кислот (Σ насыщенных 72,7-74,65%). В фосфатидилхолинах *L. sulphureus* 205 соотношение насыщенных и ненасыщенных

жирных кислот приблизительно равное с небольшим преобладанием насыщенных (табл. 48). В фосфатидилхолине *G. lucidum* 1 несколько преобладают ненасыщенные жирные кислоты (58,38%).

В кардиолипинах изученных видов грибов соотношение насыщенных и ненасыщенных кислот приблизительно равное с небольшим преобладанием ненасыщенных кислот.

Изучение антиоксидантного действия фракций липидов

Присутствие кислорода в окружающей среде и его участие в метаболических процессах неизбежно связано с образованием в клетке активных форм кислорода и протеканием процессов перекисного окисления. Перекисное окисление – сложный многостадийный цепной процесс окисления кислородом липидных субстратов, главным образом полиненасыщенных жирных кислот, включающий стадии взаимодействия липидов со свободно-радикальными соединениями и образования свободных радикалов липидной природы. Перекисное окисление представляет собой типичный цепной процесс, приводящий к образованию свободных радикалов липидов. Он играет важную роль в жизнедеятельности живых организмов (Гесслер и др., 2008).

Так, перекиси липидов используются в организме для синтеза биологически активных веществ – простагландинов, тромбоксанов, стероидных гормонов и т.д. Интенсивность перекисного окисления непосредственно связана с процессами обновления состава фосфолипидов биологических мембран, изменения относительного содержания липидов и белков и, как следствие, с изменением структуры биологических мембран и их функционирования (Капич, Шишкина, 1995; Бабицкая и др., 1997; Бадалян и др., 2003; Кваско и др., 2008).

В живых организмах существует сложная система регуляции интенсивности процесса перекисного окисления. Помимо важнейшего регуляторного компонента системы – ферментов, участвующих в образовании или нейтрализации активных форм кислорода и свободных радикалов, – чрезвычайно важное значение в регуляции процесса имеют многочисленные липофильные соединения, выполняющие функции инициа-

торов, катализаторов, ингибиторов, тушителей, синергистов перекисного окисления. Также особую роль играют соединения, обладающие проокислительными свойствами, т.е. вещества, усиливающие перекисное окисление.

В связи с этим в процессе разработки функциональных препаратов представляло интерес определить данные соединения в составе липидов изучаемых грибов. Антиоксидантную активность изучали на модели окисления линолевой кислоты.

Как известно, липиды являются многокомпонентной системой, в состав которой входят не только природные антиоксиданты, ответственные за антиокислительные свойства липидов, но и вещества, способные легко образовывать природные радикалы и инициировать процессы окисления. Таким образом, величина антиокислительной активности липидов является суммарной характеристикой и обусловлена действием всей суммы природных антиоксидантов.

Определение антиокислительной активности общих (АОА) липидов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 показало, что грибы содержат значительное количество липофильных антиоксидантов. Антиокислительная активность общих липидов достигала 97% антиокислительной активности известного антиоксиданта ионола (рис. 39).

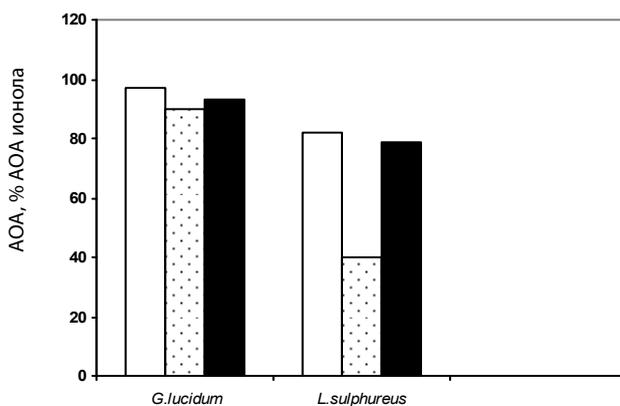


Рис. 39. Антиокислительная активность общих (□), нейтральных (▨) и полярных (■) липидов *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205

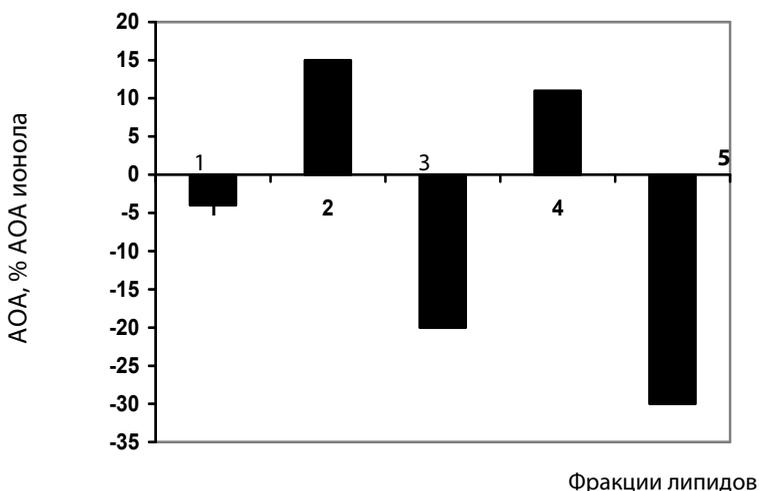


Рис. 40. Антиокислительная активность отдельных фракций нейтральных липидов *Ganoderma lucidum* 1: эфиры стеринов (1), свободные жирные кислоты (2), неидентифицированная фракция липидов $R_f = 0,167$ (3), триацилглицерины (4), эргостерин (5)

Для *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 антиокислительная активность суммарных липидов была выше, чем активность отдельных фракций. Наибольшей способностью препятствовать перекисному окислению липидов обладали полярные липиды (рис. 40).

Слабой антиоксидантной активностью обладали свободные жирные кислоты и триацилглицерины. Данное явление, вероятно, можно объяснить тем, что триацилглицерины и жирные кислоты, окисляясь, замедляли окисление линолевой кислоты, используемой в качестве индикатора перекисного окисления. Прооксидантной активностью обладали эфиры стеринов, неидентифицированная фракция липидов с $R_f = 0,167$ и эргостерин.

Изучена антиокислительная активность фракций нейтральных липидов базидиальных грибов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205. Прооксидантная активность установлена у эфиров стеринов, неидентифицированной фракции с $R_f = 0,167$ и эргостерина (рис. 40, 41).

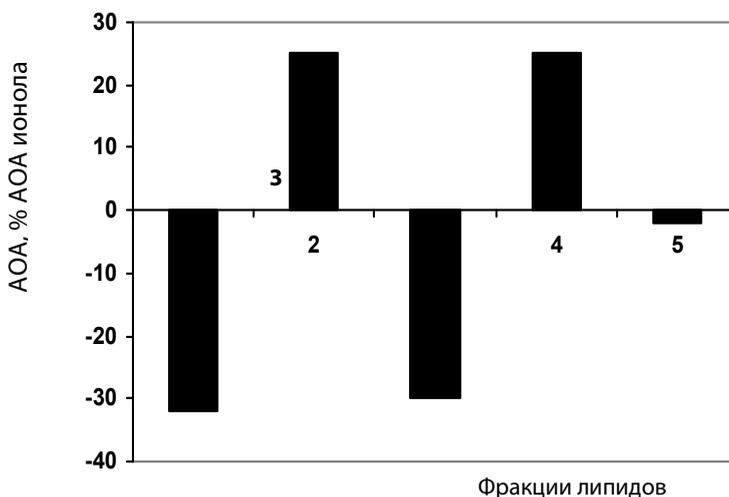


Рис. 41. Антиокислительная активность отдельных фракций нейтральных липидов *Laetiporus sulphureus* 205: эфиры стеринов (1), свободные жирные кислоты (2), неидентифицированная фракция липидов $R_f = 0,167$ (3), триацилглицерины (4), эргостерин (5)

Слабую антиоксидантную активность проявили свободные жирные кислоты и триацилглицерины.

Отличительной особенностью *L. sulphureus* 205 является накопление в значительных количествах – до 5,5% – ярко-оранжевого пигмента. В 1969 г. ярко-оранжевый пигмент из глубинного мицелия *L. sulphureus* был идентифицирован Л.Р. Дж. Валадоном с соавт. (Valadon, Mummery, 1969), отнесен к каротиноидным пигментам и назван латипороксантином. На протяжении многих лет латипороксантин был признан основным каротиноидным пигментом гриба. В настоящее время появилось иное мнение, согласно которому основной пигмент *L. sulphureus* имеет полиеновую природу. Итальянскими учеными из глубинного мицелия *L. sulphureus* ацетоном был экстрагирован ярко-оранжевый пигмент.

После фракционирования экстракта методом ВЖХ получено несколько фракций пигмента. ЯМР анализ двух преобладающих фракций пигмента (M_r 420 и M_r 402) позволил отнести данные

соединения к группе полиеновых кислот: латипоровая кислота А и 2-дегидро-3-диоксилатипоровая кислота (Davoli, 2005).

Обе структуры пигмента гриба предполагают наличие антиоксидантной активности. Для ее установления методом колоночной хроматографии нами были выделены из общего липидного экстракта пигменты гриба. Получены три фракции пигмента, различающиеся по степени полярности: нейтральная (элюировалась с колонки гексаном) – 6,9% суммы пигментов, полярная (элюировалась с колонки диэтиловым эфиром) – 87% суммы пигментов и среднеполярная (элюировалась с колонки хлороформом со спиртом) – 6,4% суммы пигментов.

Наибольшей антиокислительной активностью обладала нейтральная фракция пигмента – до 98% ионола (рис. 42). Несколько меньшая активность отмечена у полярной и среднеполярной фракций пигмента гриба – 72 и 55% ионола соответственно.

Исследование антиокислительной активности трех фракций полярных липидов показало, что наибольшей активностью обладает фосфатидилхолин, наименьшей – кардиолипин (рис. 43).

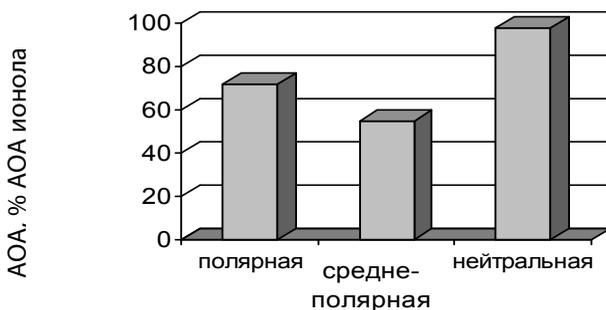


Рис. 42. Антиокислительная активность фракций пигмента *Laetiporus sulphureus* 205

У *G. lucidum* 1 антиокислительная активность отдельных фракций полярных липидов выражена в большей степени, чем у *L. sulphureus* 205.

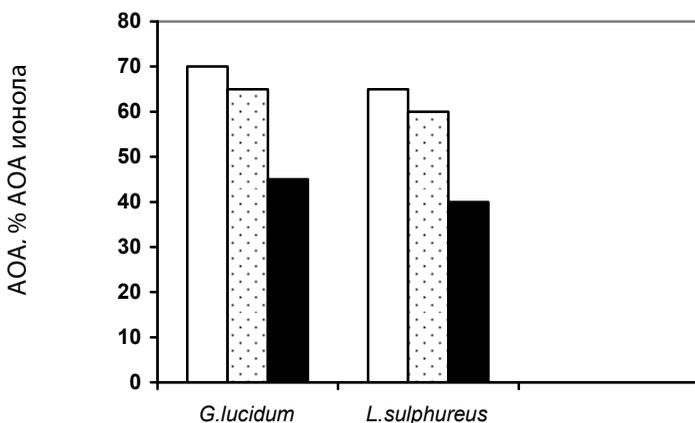


Рис. 43. Антиокислительная активность отдельных фракций полярных липидов *Ganoderma lucidum* 1, *Laetiporus sulphureus* 205: фосфатидилхолин (□), фосфатидилэтаноламин (▤) и кардиолипин (■)

Исследование антиокислительной активности спиртовых экстрактов мицелия и липидов ксилотрофных базидиомицетов дает основание полагать, что она обусловлена присутствием в грибах низко- и высокомолекулярных фенольных и липофильных соединений, в т.ч. пигментов, нейтральных липидов и фосфолипидов.

Ключевую роль в защите клеток растений и животных от окислительного стресса играют антиоксиданты, локализованные в липидной фазе мембран, т.е. липофильные антиоксиданты. Величина антиоксидантной активности липидов является одним из наиболее важных показателей физико-химической системы регуляции окислительных реакций в липидах биомембран.

Таким образом, грибы располагают средствами антиоксидантной защиты и обладают способностью инициировать реакции перекисного окисления липидов. Баланс этих процессов устанавливает интенсивность перекисного окисления липидов на определенном стационарном уровне.

Физико-химическая характеристика липидов

Сложность состава природных липидов грибов требует сочетания нескольких методов исследования, основанных на различных физических и химических принципах. Физико-химические методы изучения свойств масел и жиров, определяющие их качество, представлены в ГОСТах пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Химические и физические свойства жиров зависят от содержащихся в них жирных кислот. Показатели свойств жиров, отличающиеся некоторым постоянством и характеризующие их свойства, называются числами жира (часто их неправильно называют «константы» жира). Из химических чисел жира наибольшее значение имеют числа Рейхерта-Мейссля, Поленске, омыления и йодное.

Число Рейхерта-Мейссля показывает наличие свободных низкомолекулярных жирных кислот, растворимых в воде и испаряющихся при нагревании.

Число Поленске показывает наличие свободных низкомолекулярных жирных кислот, нерастворимых в воде и испаряющихся при нагревании.

Число омыления или число Кеттсторфера – количество миллилитров едкого калия, которое требуется для омыления связанных и нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г исследуемого жира. Это число различно для разных жиров и зависит от их химического состава. На 1 г жиров требуется больше едкого калия, если в состав их входят жирные кислоты с малым молекулярным весом, так как в этом случае в навеске будет больше глицеридов, чем при содержании высокомолекулярных кислот. Известно также, что независимо от вида жирных кислот, входящих в молекулу жира, для омыления ее требуется три молекулы едкого калия.

За **неомыляемые вещества** принимают входящие в состав жиров вещества, а также их примеси, не реагирующие с едкими щелочами в условиях, при которых происходит омыление, – это стерин, витамины, пигменты и др.

Йодное число показывает, сколько граммов йода требуется для насыщения непредельных жирных кислот в 100 г жира. Это наиболее важный показатель для жиров, так как характеризует степень их ненасыщенности и во многом определяет

физические и биологические свойства. Этот показатель зависит от многих факторов, в т.ч. связанных с условиями культивирования.

Перекисное число характеризует степень окисления жира и определяется количеством йода (г), выделенного из йодистого калия перекисями, содержащимися в 100 г жира.

Родановое число представляет интерес при определении различных компонентов смеси жирных кислот. Это условная величина, показывающая число граммов родана, выраженное в эквивалентном количестве йода, вступающего во взаимодействие со 100 г исследуемого жира.

Кислотное число – количество миллиграммов гидроокиси калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в одном грамме жира.

Эфирное число – масса гидроокиси калия (мг), необходимая для омыления всех сложных эфиров, содержащихся в 1 г органического вещества. Характеризует содержание в веществе сложных эфиров и определяется разностью между числом омыления и кислотным числом.

Число Генера показывает процентное содержание нерастворимых в воде жирных кислот в сумме с неомыляемыми компонентами, содержащимися в жире.

Из физических показателей главными являются: температура плавления и застывания, растворимость, плотность, коэффициент преломления.

Температура плавления жира – температура, при которой жир приобретает подвижность.

За **температуру застывания** жирных кислот принимают температуру, при которой происходит их переход из жидкого состояния в твердое.

Определение плотности масел – это отношение массы масла (жиров) при 20 °С к массе воды в том же объеме при 4 °С или той же температуре.

Коэффициент преломления – важнейшая величина, дающая представление о составе липидов, эфирных масел и других соединений. Этот показатель определяется как отношение синуса угла наклона к синусу угла рефракции.

Для изучения химических и физических свойств грибных липидов использовались соответствующие ГОСТы (Руководство ..., 2003; Жиры ..., 2005).

Данные о физико-химических свойствах липидов грибов и растительных масел приведены в табл. 49, 50. Грибные липиды отличаются от растительных масел в основном числом омыления, средней молекулярной массой, числом Рейхерта-Мейссля и Поленске. Обусловлено это тем, что их подвергают очистке. По степени очистки растительные масла разделяют на нерафинированные и рафинированные. К нерафинированным относятся масла, подвергнутые частичной очистке – отстаиванию, фильтрации, гидратации и нейтрализации. При этом удаляется часть фосфатидов. Рафинированные масла подвергаются обработке по полной схеме рафинации, включающей механическую очистку, гидратацию, нейтрализацию (щелочную очистку), дезодорацию (удаление ароматических веществ), адсорбционную рафинацию, в процессе которой поглощаются красящие вещества, а масло осветляется и обесцвечивается. В биологическом отношении рафинированные растительные масла менее ценны, поскольку в них теряется значительная часть стеринов и фосфатидов (например, в соевом масле после рафинации остается 100 мг % фосфатидов вместо 3000 мг % исходных).

Полученные нами результаты сравнения химических свойств липидов *G. lucidum* 1 и *L. sulphureus* 205 с растительными маслами свидетельствуют о более высоком (в 1,7-1,9 раза), чем у растительных масел числе омыления у *G. lucidum* 1 и более чем в 120-160 раз у *L. sulphureus* 205 числе Рейхерта-Мейссля, а также более низкой (в 1,8-2 раза) средней молекулярной массе жирных кислот (табл. 49). Это указывает на наличие в липидах грибов большого количества низкомолекулярных короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), т.е. кислот с числом углеродных атомов в молекуле до 10 (муравьиная, масляная, уксусная, пропионовая, изовалериановая, капроновая, каприловая, каприновая и т.д.).

Значение этих кислот велико. КЦЖК способствуют устранению дисбиотических процессов, нормализуют метаболическую активность микрофлоры кишечника и во многом определяют колонизационную резистентность слизистой кишечника. КЦЖК участвуют в регуляции двигательной

активности толстого кишечника, улучшают абсорбцию ряда микроэлементов, в частности кальция, магния, железа, а также воды, усиливают экспрессию генов, определяющих синтез ферментов, обеспечивающих защиту клетки от свободно-радикального повреждения.

Таблица 49. Химические свойства липидов *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205 в сравнении с различными растительными маслами

Химические свойства	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205	Масло		
			кукурузное	облепиховое	подсолнечное
Перекисное число, % йода	0,015	0,015	-	-	-
Йодное число	130	123	120	132	128
Родановое число	82	80	77-78		74-82
Массовая доля веществ, нерастворимых в эфире, %	2,9	2,5			
Кислотное число	59,42	80,59	-	-	-
Эфирное число	255,97	294,83	-	-	-
Число омыления	315,39	375,42	190	198	190
Средняя молекулярная масса жирных кислот	178	149	-	-	280
Массовая доля неомыляемых веществ, %	16,1	10,22	-	-	0,5
Число Рейхерта-Мейссля	4,72	98,4	0,3-2,5	0,2-0,5	0,63
Число Поленске	1,3	5,8	-	-	-
Число Генера	90	80,1	94	-	94,5

Продукты, содержащие короткоцепочечные жирные кислоты, с успехом используются в функциональном питании практически здоровых людей и пациентов с различными вариантами интоксикации, воспалительной патологии кожи и внутренних органов, патологии сердечно-сосудистой системы, ожирением, сахарным диабетом 2-го типа, нарушениями функций иммунной системы, дисбактериозе, аллергической патологии, в акушерско-гинекологической практике.

Качественный состав липидов определяет их химические и физические свойства. В зависимости от содержания непредельных жирных кислот меняется консистенция растительных масел и температура их застывания: у жидких масел, содержащих больше непредельных жирных кислот, температура застывания обычно ниже нуля, у твёрдых масел, содержащих больше насыщенных жирных кислот, – почти 40 °С. Несмотря на то, что качественный и количественный состав жирных кислот грибных липидов близок к таковому у растительных пищевых масел, температура плавления и застывания липидов жиров напрямую не зависит от ненасыщенности жирных кислот, входящих в их состав. Это можно объяснить тем, что масла в основном состоят из триглицеридов (94-96%), в то время как в составе грибных липидов содержание триглицеридов не превышает 30% липидов и сравнимо с содержанием в них фосфолипидов – от 25 до 40%. В них много стероидных соединений, восков, гликолипидов, пигментов и витаминов липофильной природы. Гетерогенный состав нативных грибных липидов подтверждается и завышенным, по сравнению с растительными промышленными маслами, массовым числом веществ, нерастворимых в эфире (табл. 50).

На основании температуры плавления и застывания липиды грибов *L. sulphureus* и *G. lucidum* 1 можно отнести к твердым. Сравнивая состав жирных кислот липидов грибов и растительных масел, следует отметить их сходство, так, сумма ненасыщенных жирных кислот в растительных маслах и липидах грибов практически одинакова (табл. 51).

Таблица 50. Физические свойства липидов *Ganoderma lucidum* 1 и *Laetiporus sulphureus* 205 в сравнении с различными растительными маслами

Физические свойства	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205	Масло		
			кукурузное	облепиховое	подсолнечное
Удельный вес, г/см ³	0,848	0,751	0,924	0,926	0,927
Температура плавления, °С	32-34	42-45	-	-	16-19
Температура застывания, °С	28	38-40	-10	-20	-
Коэффициент преломления	1,452	1,445	1,475	1,472	1,474

Таблица 51. Жирнокислотный состав липидов *Ganoderma lucidum* 1, *Laetiporus sulphureus* 205 и растительных масел

Физические свойства	<i>G. lucidum</i> 1	<i>L. sulphureus</i> 205	Масло		
			кукурузное	облепиховое	подсолнечное
C _{14:0}	0,62	0,32	-	-	1
C _{16:0}	22,27	14,36	7,7	11-12*	6-9
C _{18:0}	0,63	0,19	3,5	-	1,6-4,6
C _{18:1}	4,67	9,84	44,5	23-42	24-40
C _{18:2}	71,22	75,11	41-48	32-36	46-72
C _{18:3}	0,06	-	-	14-27	1

* – Суммарное содержание пальмитиновой (C_{16:0}) и стеариновой (C_{18:0}) кислот.

Полученные результаты подтверждают высокую биологическую ценность самих грибов и их липидных компонентов, а также определяют перспективность разрабатываемых функционально-корректирующих препаратов на их основе.

СОЕДИНЕНИЯ УГЛЕВОДНОЙ ПРИРОДЫ

Биологическую активность большинства видов грибов во многом определяют соединения углеводной природы, содержание которых достигает 60% сухой биомассы грибов (Wasser, Weis, 1999). Они представлены свободными и связанными сахарами, а также полисахаридами. Эти вещества выполняют резервную, осморегулирующую, регуляторную и протекторную функции. Интересны эти соединения и как маркеры, имеющие существенное значение в систематике царства *Fungi* (Феофилова и др., 1996, 1999). С установлением в начале 70-х гг. прошлого столетия группой японских учёных онкостатического действия полисахаридов, выделенных из плодовых тел некоторых базидиальных грибов, началось активное изучение этих соединений, а также поиск их продуцентов (Reshetnikov et al., 2001).

Полисахариды – разнообразная по структуре группа биологических макромолекул, широко распространённых в природе. Они состоят из повторяющихся структурных единиц – моносахаридных остатков, соединённых между собой гликозидными связями. По сравнению с белками и нуклеиновыми кислотами полисахариды обладают более высокой способностью переноса биологической информации, так как имеют самый большой потенциал для структурной изменчивости. Эта огромная потенциальная изменчивость в структуре полисахаридов позволяет точно регулировать механизмы различного взаимодействия клеток и в более высоко организованных организмах (млекопитающие, человек) (Бандюкова, Лигай, 1997).

Полисахариды в клетках грибов топологически и функционально неоднородны. Их можно разделить, согласно Н.П. Елинову (1989), на разные группы:

- по топологии: клеточные и внеклеточные;
- по топологии и функции: внутриклеточные (модификаторы, запасные питательные вещества, в структуре гликоконъюгатов), полисахариды клеточной стенки (структурные, структурно-метаболические), внеклеточные полисахариды (структурно-метаболические при гиперпродукции и собственно внеклеточные, по преимуществу защитные).

Исследование полисахаридов сопряжено с множеством задач, которые сводятся в основном к фракционированию, очистке, определению качественного и количественного состава мономерных единиц, размеров циклов моносахаридов, входящих в молекулу полимера, мест их соединения, наличия боковых цепей и типов гликозидных связей, конфигурации гликозидных связей, молекулярной массы. Всё это позволяет выяснить первичную структуру полисахарида (Елинов, 1989).

Содержание полисахаридов в биомассе грибов достаточно высокое. Стенки гиф часто содержат более 75% полисахаридов. В состав клеточной стенки входит много биополимеров, среди которых преобладают полиаминосахариды и глюканы. Наибольшее применение из них получили хитин и хитозан (Феофилова и др., 1996).

Кроме опорной функции в гифах грибов полисахариды образуют внеклеточный футляр, окружающий мицелий. В природе экзополисахариды грибов служат для адгезии их к субстратам, иммобилизации внеклеточных ферментов, предотвращения дегидратации гиф, хранения избыточных питательных веществ. Некоторые исследователи считают, что образующие чехол гиф полисахариды принимают участие в деградации лигнинов (Gutierrez et al., 1996). При глубинном культивировании грибов экзополисахариды частично растворены в культуральной среде.

Глюканы по типу связи представлены α - и β -глюканами. Большая часть глюканов – водонерастворимые линейные полимеры, состоящие из глюкозных остатков, соединённых α -(1 \rightarrow 3)-связями. Ещё одну группу составляют глюкозные полимеры, содержащие 1 \rightarrow 3 и 1 \rightarrow 4- связи. Наиболее широко распространена среди грибов группа β -глюканов. Они представлены: линейными глюканами; β -(1 \rightarrow 3) связанными глюканами, содержащими в молекуле редко встречающиеся β -(1 \rightarrow 6)-связи; фосфорилированными глюканами; глюканами, имеющими β -(1 \rightarrow 3)- и значительное количество β -(1 \rightarrow 6)-связей; глюканами, имеющими 1 \rightarrow 6-связи, а также β -(1 \rightarrow 3)-, β -(1 \rightarrow 4)- и β -(1 \rightarrow 6)-связи. Преобладающим типом глюкана у грибов является β -(1 \rightarrow 3)-глюкан, содержащий разветвлённые боковые ветви с β -(1 \rightarrow 6)-связями. Ряд химических свойств глюканов, а именно отличия в растворимости их в воде и щёлочи, связаны с

размерами полимера, степенью ветвления цепи, упаковкой цепей (Щерба и др., 1998).

Различия в составе, типе гликозидных связей, степени ветвления полисахаридов оказывают влияние на вторичную и третичную структуры одиночных цепей и их макромолекулярные агрегаты, определяя физические свойства полимера (Gutierrez et al., 1996).

Согласно литературным данным, β -гликозидные связи довольно распространены в природе (Wang et al., 1996; Babitskaya et al., 2000a, b; Manzoni, Rollini, 2001; Kim et al., 2002). Они присутствуют у высших растений, водорослей и микроорганизмов (Бандюкова, Лигай 1997; Manzoni, Rollini, 2001). Промышленный интерес к β -глюканам обусловлен их биологической активностью. Показано, что полисахариды, выделенные из *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Phellinus* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, обладают гипохолестеролемическими и противоопухолевыми свойствами (Wasser, 2010).

В последнее время внимание исследователей привлекают полисахариды, полученные не только из плодовых тел, но также из глубинного мицелия и культуральной жидкости (Wang et al., 1996; Kim et al., 2002), однако они до сих пор остаются мало изученными. Но есть все основания полагать, что по своему строению и свойствам они будут мало отличаться от полисахаридов плодовых тел. Более того, технологическая схема получения внеклеточных полисахаридов и эндополисахаридов из глубинного мицелия значительно проще по сравнению с получением их из плодовых тел (Kim et al., 2002).

Оценивая состав и строение различных полисахаридов, экстрагируемых из биомассы гриба, следует помнить, что гликаны находятся, как правило, в связанном состоянии как между собой, так и с другими биополимерами клетки. В процессе выделения и очистки связи могут разрываться, поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы можно было с уверенностью говорить о правомочности и объективности предполагаемых структур. При изучении экзополисахаридов получить нативные полисахариды и полисахарид-белковые комплексы значительно проще. К тому же, можно получать более высокий выход экзополисахаридов, чем внутриклеточных гликанов из плодовых тел.

Образование полисахаридов, как и других компонентов, определяется условиями культивирования объекта исследования – содержанием питательных компонентов в среде, аэрацией, температурой, pH и другими факторами.

СКРИНИНГ ВИДОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ПОЛИСАХАРИДОВ

Отбор активных продуцентов полисахаридов среди изученных видов и штаммов показал, что при выращивании на пивном сусле они накапливают 5,3-15 г/л биомассы, на глюкозо-пептонной среде – 3,5-13 г/л. Наибольший выход экзо- (4,0-8,5 г/л) и эндополисахаридов (8-15,2 %) отмечен при выращивании грибов на пивном сусле (табл. 52). Хорошими продуцентами полисахаридов, особенно внутриклеточных, оказались штаммы *Crinipellis schevczenkovi*. Все изученные штаммы активно растут на пивном сусле и на глюкозопептонной среде. Выход их биомассы достигает 12-13 г/л (см. табл. 52). Содержание полисахаридов в мицелии *C. schevczenkovi*, полученном при выращивании грибов на пивном сусле, составило 4,5-6,5%, на глюкозопептонной среде – всего 1,8-2%.

Наибольшее количество эндополисахаридов продуцируют штаммы *Lentinus tigrinus* 1 и *L. lepideus* 1, экзополисахаридов – штаммы *Ganoderma lucidum* (см. табл. 52). На основании комплексной оценки биосинтетической активности исследованных видов и штаммов, включающей в себя продуктивность биомассы, эндо- и экзополисахаридов, были отобраны перспективные продуценты полисахаридов: штаммы *G. lucidum* 16, *L. lepideus* 1, *L. tigrinus* 1, *L. edodes* 182 и *C. schevczenkovi* 43 (Щерба и др., 2002).

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ

Влияние природы источников углерода, азота и соотношения C:N на образование базидиомицетами экзо- и эндополисахаридов. Кинетические параметры роста культур и биосинтеза полисахаридов. Оптимизация состава сред

Эффективность биотехнологического процесса, базирующегося на глубинном культивировании грибов, определяется, главным образом, технологичностью жидкой питательной среды, количеством и качеством входящих в неё источников углеродного и азотного питания. Для изучения влияния различных источников углерода и азота на выход биомассы, экзо- и эндополисахаридов грибы выращивали на полусинтетической глюкозопептонной среде. В исходной питательной среде заменяли глюкозу или пептон соответствующими источниками углерода и азота в эквивалентных количествах (Щерба, Бабицкая, 1997; Пучкова и др., 2002а, б; Babitskaya et al., 2000а).

*Таблица 52. Образование биомассы и полисахаридов различными видами и штаммами базидиальных грибов при глубинном культивировании на средах разного состава**

Штамм	Биомасса, г/л		Эндополисахариды, %		Экзополисахариды, г/л	
	С**	Г-П***	С	Г-П	С	Г-П
	2	3	4	5	6	7
<i>Lentinus edodes</i>						
21	6	3,5	2,6	2,5	2,5	0,8
182	12,5	7,2	4,5	3	4	3
23	7,8	4,4	3,1	2	1,8	1
24	9,3	6,5	3,5	1,7	1	0,6
25	12	7,1	4	3,2	3	1

Продолжение табл. 52

1	2	3	4	5	6	7
26	7,8	6,3	3	2,9	2	1
IBK 1712	10	6	2,9	2,5	1,7	1,2
IBK 998	6,5	5,5	2	1,5	2	1
1	5,7	4	3,2	2,4	3,5	-
2	5,7	3,5	3	2,5	2,9	-
3	7,5	5,7	2,9	2	3	1,5
4	7	3,5	2,6	2,5	2,5	0,8
5	7	6	2,7	1,8	3	-
6	5,3	4,5	2,5	2	2	1
7	6,3	6	3,1	2,8	3,4	-
8	5,5	5,2	3	2,8	2,7	2,5
9	5,8	5	2,8	1,6	2,5	-
10	5,7	4,8	2,8	1	2,7	2
11	9,5	7,2	4,5	3	3,3	2,5
12	7,8	7,3	3,2	3	3,3	-
13	6,2	6	2,8	2,7	2,5	-
IBK 1709	9,0	6,4	2,3	1,5	1,9	-
IBK 1711	9,8	4	1,2	1,8	1,8	-
196	9,3	5,6	1,1	2	1,6	0,7
IBK 1710	10,6	8,5	4,5	1,7	1	-
198	13,0	7,2	5,0	3,4	3,5	1
199	8,2	6,5	5,5	3,9	2	1
200	5,5	7,1	1,9	1,3	1	-
201	5	4,6	1,8	1,3	-	-
217	5,9	7,7	1,5	1,9	2,2	0,8
IBK 507	12	7	2,6	2,9	1,7	1,1
<i>L. lepideus</i>						
1	150	10	15,2	8,5	1,2	1
<i>L. tigrinus</i>						
1	12,5	11,2	13,6	6,6	3,4	2,8
2	11,5	9,7	11,7	5,2	3,2	2,5
<i>Ganoderma lucidum</i>						
15	10	8	6,5	4	3	2,5

1	2	3	4	5	6	7
16	11,4	8,5	7,5	7	8	2,5
17	8	6,5	6,8	5	4	3
171	11	7,6	6,5	6	6	2,2
1	10	9,5	7	5,8	4	3,5
IBK 1787	11,5	9	7	5,5	4,5	3
IBK 921	8	9	6,8	5	4	2
IBK 1607	6,5	8	6,4	4	3,5	3
IBK 1608	12,5	9,5	8,5	6	6	4
<i>Crinipellis schevczenkovi</i>						
43	12,5	13	6,5	2	2	0,8
44	9	12	4,5	1,9	1,3	1,2
45	11	12	5,3	1,8	1,8	1

* – Средние значения показателей, которые соответствуют первому порогу доверительной вероятности ($\beta = 0,95$); ** – пивное сусло 7 °Б; «-» – не исследовали; *** – глюкозопептонная среда.

В качестве источников углерода использовали моно-, ди- и полисахариды, а также полиолы. Из исследованных источников углерода лучшими для роста и образования полисахаридов *G. lucidum* 16, *L. edodes* 182 и *C. schevczenkovi* 43 оказались глюкоза, лактоза и крахмал. Выход эндополисахаридов на среде с глюкозой составил 5,5-8,5%, с лактозой – 3,6-9,5%, с крахмалом – 3,3-6,7% (табл. 53, 54).

Однако у исследуемых видов грибов отмечены и некоторые различия: наибольшее количество внутриклеточных полисахаридов *G. lucidum* 16, *C. schevczenkovi* 43, *L. lepideus* 1 и *L. tigrinus* 1 образовывали на среде с глюкозой (табл. 53, 55, 56), *L. edodes* 182 – с целлобиозой (табл. 54). Для синтеза экзополисахаридов *C. schevczenkovi* 43 лучшим источником углерода оказался крахмал (4,0 г/л), *G. lucidum* 16 – глюкоза (2,5 г/л), *L. edodes* 182 – целлобиоза (3,4 г/л) (табл. 53, 54).

Таблица 53. Влияние различных источников углерода на рост *Ganoderma lucidum* 16 и образование полисахаридов

Источник углерода	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
Глюкоза	8,5	2,5	0,29	7
Арабиноза	4,5	1,2	0,26	3,5
Галактоза	4,5	0,8	0,17	3,7
Ксилола	5	1,2	0,2	3,5
Манноза	5,1	1	0,2	3,6
Фруктоза	4,9	1,2	0,18	3,4
Лактоза	8	2,3	0,29	6,8
Мальтоза	7,4	2,0	0,27	5,6
Сахароза	5,8	2,5	0,38	4,4
Маннит	6,1	1,6	0,2	2
Крахмал	8,4	2,5	0,3	6,6
Целлюлоза	8	1,8	0,22	6

Таблица 54. Влияние различных источников углерода на рост *Lentinus edodes* 182

Источник углерода	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
Глюкоза	6,5±0,2	2,9±0,2	0,44	3,5±0,2
Арабиноза	3,0±0,3	1,2±0,1	0,40	2,8±0,2
Галактоза	3,5±0,4	1,7±0,3	0,48	2,5±0,1
Ксилоза	3,2±0,2	1,6±0,2	0,50	2,9±0,3
Манноза	4,6±0,4	1,3±0,1	0,28	2,0±0,2
Фруктоза	3,3±0,2	1,1±0,1	0,33	2,3±0,1
Лактоза	6,2±0,3	2,7±0,2	0,44	3,2±0,3
Мальтоза	6,4±0,2	1,9±0,1	0,29	2,8±0,2
Сахароза	5,8±0,2	2,0±0,2	0,34	2,8±0,2
Целлобиоза	6,8±0,4	3,4±0,2	0,5	4,5±0,3
Маннит	3,2±0,3	1,1±0,1	0,34	2,5±0,1
Сорбит	4,5±0,2	1,7±0,1	0,38	2,0±0,2

Таблица 55. Влияние различных источников углерода на рост *Lentinus lepideus* 1

Источник углерода	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
Глюкоза	10	1	0,1	8,5
Арабиноза	5	0,2	0,04	6,8
Галактоза	5,5	0,4	0,07	6,5
Ксилоза	6,2	0,5	0,08	5,9
Манноза	5,6	0,5	0,08	6
Фруктоза	5,3	0,3	0,06	6,3
Лактоза	8,5	1	0,11	7,3
Мальтоза	8	1	0,12	8,4
Сахароза	7,7	0,9	0,11	7,9
Маннит	5,8	0,4	0,07	6,5
Крахмал	9,8	0,8	0,08	7,8
Целлюлоза	8,6	0,8	0,09	7,7

Таблица 56. Влияние различных источников углерода на рост *Lentinus tigrinus* 1

Источник углерода	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
Глюкоза	11,2	2,8	0,25	6,6
Арабиноза	4	1	0,25	5,8
Галактоза	4,5	1	0,22	5,5
Ксилоза	5,2	1,6	0,31	5,9
Манноза	7,6	2,3	0,3	6
Фруктоза	4,3	1,1	0,26	5,8
Лактоза	7,2	2	0,28	6,3
Мальтоза	8,6	2,6	0,3	6,2
Сахароза	4	2	0,5	6,4
Маннит	4,2	0,9	0,21	5,5
Крахмал	10,8	2	0,19	6,6
Целлюлоза	9	2	0,22	6,6

Повышение концентрации глюкозы до 30-40 г/л способствовало увеличению выхода биомассы и содержанию полисахаридов у исследуемых видов. Максимальное количество эндополисахаридов (9-9,2%) содержалось в биомассе *L. lepidus* 1, а самый высокий синтез экзополисахаридов (4-5,2 г/л) наблюдался у *L. edodes* 182 (Scherba et al., 1999). Увеличение содержания глюкозы в среде с 30 до 40 г/л незначительно влияло на повышение биомассы и содержание эндополисахаридов (табл. 57, 58).

Таблица 57. Влияние начальных концентраций глюкозы на рост и образование полисахаридов разными видами р. *Lentinus* при глубинном культивировании на глюкозо-пептонной среде

Содержание глюкозы, г/л	Биомасса, г/л	Остаточное содержание источника углерода, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
			г/л	г/г а.с.б.	
<i>L. edodes</i> 182					
10	6	2	2,4	0,4	3
20	7,2	8	3	0,41	3
40	11	21,5	5,2	0,47	4
50	9,5	32,4	5	0,53	3,8
<i>L. lepidus</i> 1					
10	6,8	3,2	0,7	0,1	8
20	10	6,1	1	0,1	8,5
30	11	10,6	2,2	0,2	9
40	12,4	20,4	2,4	0,21	10,2
50	11,2	28,2	2,6	0,23	9,2
<i>L. tigrinus</i> 1					
10	7,6	1,5	1,8	0,23	6,3
20	11,2	5,9	2,8	0,25	6,6
30	13,2	10,2	3,5	0,26	7
40	13,5	19,7	4	0,29	8,4
50	13,3	25,3	4,7	0,35	7,1

При содержании глюкозы 50 г/л и выше выход биомассы и содержание в ней полисахаридов несколько снижались, что

может быть обусловлено несбалансированностью среды по соотношению углерода и азота (табл. 57, 58).

Таблица 58. Влияние начальных концентраций глюкозы при глубинном культивировании на глюкозопептонной среде на рост и образование полисахаридов *Ganoderma lucidum* 16

Содержание глюкозы, г/л	Биомасса, г/л	Остаточное содержание источника углерода, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
			г/л	г/г а.с.б.	
10	7	2	1,8	0,26	6,5
20	8,5	8	2,5	0,29	7
30	9,6	12	3,5	0,36	7,6
40	10	21,5	5,4	0,54	8
50	9,5	22,4	5	0,53	7,7

Таблица 59. Влияние источников азота на рост *Lentinus lepideus* 1 и образование полисахаридов

Источник азота	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
NaNO ₃	6,2	0,8	0,08	7,4
NH ₄ NO ₃	6,4	0,9	0,09	7
NH ₄ Cl	8,6	0,7	0,08	7,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	9	0,9	0,1	7,5
Пептон	10	1	0,1	8,5
Дрожжевой экстракт	9,5	1	0,1	8
Кукурузный экстракт	9,7	1,1	0,11	8,3

Однако максимальное значение эффективности биосинтеза, рассчитанное как отношение массы синтезированных полисахаридов к массе внесённого источника углерода, получено при выращивании грибов на средах с 30 г/л глюкозы или лактозы. При использовании таких вариантов сред остаточное содержание сахаров не превышало 0,8%, в то время как на более богатых средах их количество достигало 12-15 г/л.

Изменение концентрации источника фосфора не влияло на выход биомассы и полисахаридов.

Выбор источника азота также очень важен для хорошего роста мицелия в культуре и содержания в нём белка. В качестве источников азота использовали неорганические (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) и органические (пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты). По данным литературы из органических источников азота для большинства видов грибов лучшими были пептон, кукурузный и дрожжевой экстракты (Elisashvili et al., 2002; Fan et al., 2003), из неорганических – сульфат аммония (Пучкова и др., 2001). Заметных различий в выходе экзо- и эндополисахаридов в зависимости от источника азота у изученных нами видов не наблюдалось (табл. 59-62). Из исследованных источников азота оптимальным для образования полисахаридов *C. schevczenkovi* 43, *L. lepideus* 1, *L. tigrinus* 1 и *G. lucidum* 16 оказался пептон, *L. edodes* 182 – сульфат аммония и пептон (табл. 59-62). Экономический коэффициент синтеза полисахаридов у этих видов был достаточно высоким на всех используемых источниках азота.

Таблица 60. Влияние источников азота на рост *Lentinus tigrinus* 1 и образование полисахаридов

Источник азота	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
NaNO_3	7	1,2	0,17	5
NH_4NO_3	7,2	1,3	0,18	5,3
NH_4Cl	10	2,3	0,23	5,4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,5	2,5	0,24	6
Пептон	11,2	2,8	0,25	6,6
Дрожжевой экстракт	10,7	2,5	0,23	6,4
Кукурузный экстракт	11	2,6	0,24	6,5

По литературным данным (Yang et al., 2000), добавление в среду поверхностно-активных веществ (подсолнечное масло, Tween) стимулировало рост мицелия, увеличивало выход

биомассы, экзополисахаридов и сокращало время культивирования, однако затрудняло процесс выделения и очистки полисахаридов.

Таблица 61. Влияние источников азота на рост *Lentinus edodes* 182 и образование полисахаридов

Источник азота	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
NaNO ₃	4,4±0,3	2,6±0,2	0,59	2,9±0,1
NH ₄ NO ₃	5,2±0,2	2,6±0,2	0,5	2,5±0,1
NH ₄ Cl	4,9±0,1	2,4±0,1	0,48	2,7±0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0±0,3	2,8±0,1	0,46	3,5±0,1
Пептон	6,5±0,2	2,9±0,2	0,44	3,5±0,2
Аспарагин	6,2±0,4	2,5±0,3	0,4	2,5±0,2
Мочевина	2,7±0,1	1,2±0,1	0,44	2,4±0,1

Таблица 62. Влияние источников азота на рост *Ganoderma lucidum* 16 и образование полисахаридов

Источник азота	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, %
		г/л	г/г а.с.б.	
NaNO ₃	5,4	1,5	0,28	3,9
NH ₄ NO ₃	5,9	1,6	0,27	3,8
NH ₄ Cl	6,4	1,8	0,28	5,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	8	2,4	0,3	6,5
Пептон	8,5	2,5	0,29	7
Дрожжевой экстракт	8,2	2,5	0,3	6,8
Кукурузный экстракт	8,3	2,5	0,3	6,6

Механизм стимулирующего действия растительных масел объясняется тем, что жирные кислоты частично встраиваются в мембраны клеток, увеличивают их проницаемость и способствуют поступлению питательных веществ из культуральной среды, а также могут непосредственно влиять на ферменты, участвующие в синтезе экзополисахаридов (Yang et al., 2000).

На рост и развитие базидиомицетов в процессе культивирования существенное влияние оказывают макро- и микроэлементы, присутствующие в различных концентрациях в питательной среде. Наибольшее влияние оказывают CaCl_2 , MgSO_4 , KH_2PO_4 и K_2HPO_4 (Hwang et al., 2003).

Для оптимизации процесса биосинтеза полисахаридов отобранными штаммами проведена серия экспериментов на питательных средах, в которых содержание глюкозы либо лактозы составляло 30 г/л при различном соотношении C:N. В качестве источника азота использовали пептон и сульфат аммония.

Таблица 63. Влияние соотношения C:N на биосинтез полисахаридов различными видами грибов при глубинном культивировании на глюкозопептонной среде

C:N	Биомасса, г/л	Остаточное содержание источника углерода, %	Экзополисахариды, г/л	Эндополисахариды, % биомассы	ЭК синтез, % использованного источника углерода	
					Экзополисахариды	Эндополисахариды
<i>Lentinus edodes</i> 182						
18	10,5	1,2	4,5	6,9	25	4,03
25	9,8	1,3	4,8	6,2	28,2	3,57
29	10	1,4	4,2	5	26,25	3,12
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43						
18	18	0,4	3,5	8,1	13,46	5,6
25	18,5	0,4	4,6	5,4	17,7	3,84
29	15	0,7	4,2	5,1	15,78	3,32
<i>Ganoderma lucidum</i> 16						
18	12	0,6	5,5	12,6	22,90	6,3
25	11,7	0,8	6,2	9,8	28,18	5,21
29	10	0,9	5,7	7,2	27,14	3,42

Проведенные исследования позволили оптимизировать составы питательных сред для роста грибов и активного образования ими полисахаридов. Для *L. edodes* 182 и

C. schevczenkovi 43 такой средой оказалась модифицированная глюкозопептонная среда (г/л: глюкоза – 30; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; MgSO_4 – 0,25; пептон – 3,5; кукурузный экстракт (КЭ) – 2), для *G. lucidum* 16 – среда с лактозой и сульфатом аммония (г/л: лактоза – 30; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; MgSO_4 – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,4; КЭ – 2).

Оптимизация основных биотехнологических параметров (температура, pH среды, аэрация) для получения биомассы грибов с высоким содержанием полисахаридов

Одним из важнейших факторов, регулирующих рост и синтез вторичных метаболитов базидиомицетами в культуре, является pH питательной среды. Этот фактор обуславливает физиологическую активность культур, влияет на свойства клеточных стенок, транспорт питательных веществ, скорость роста и характер метаболизма, а также способность усваивать те или иные источники питания. Как показали исследования, штаммы *G. lucidum* растут в широком диапазоне начальных значений pH среды, от 3 до 7,5 и выше. Наибольший выход биомассы наблюдался при исходном pH 6-7. Снижение pH от 6 до 3 приводило к более активному образованию как эндо-, так и экзополисахаридов. Наибольшая продуктивность отобранного штамма *G. lucidum* по этим показателям отмечена при pH 4-6 (экзо-) и 5-6,5 (эндополисахариды) (Бабицкая, 2003) (табл. 64).

Близкие результаты были получены для штаммов этого вида другими исследователями (Fang, Zhong, 2002), которые также отметили различия во влиянии исходного pH среды на рост грибов и продукцию ими полисахаридов.

В отличие от *G. lucidum*, ксилотрофный базидиомицет *C. schevczenkovi* максимальное количество биомассы накапливал при исходном pH среды 6-6,5. Эти же значения pH оказались наиболее благоприятными для синтеза как экзо-, так и эндополисахаридов (табл. 64). Снижение pH (3) сопровождалось уменьшением биомассы и более резким снижением в биомассе и культуральной среде содержания полисахаридов. Самая высокая продуктивность гриба по образованию полисахаридов отмечена при исходном pH среды 6-6,5.

Таблица 64. Влияние pH на образование биомассы и полисахаридов различными видами грибов при глубинном культивировании на оптимизированных по составу питательных средах

pH		Биомасса, г/л	Экзополисахариды, г/л	Продуктивность биосинтеза экзополисахаридов, мг/л сут	Эндополисахариды, %	Продуктивность биосинтеза эндополисахаридов, мг/л сут
исходный	конечный					
<i>Ganoderma lucidum</i> 16						
3	2,6	5	4,3	537,5	10,5	66,3
4	2,8	7,2	6,5	812,5	12,8	115,2
5	2,8	9,9	6,3	787,5	12,6	156
6	2,9	12	6,2	775	11,6	174
6,5	2,8	12,7	4,6	575	9,5	150,8
7	2,9	11,8	4,6	575	9	132,8
7,5	2,9	9,5	3,8	475	8,5	100,9
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43						
3	3,9	10	2,6	325	3,6	45,0
4	4,1	16	4,0	500	4	80
5	4,8	16,3	4,5	562	6	122,3
6	5,4	17,8	4,8	600	8	178,0
6,5	5,4	18,7	5,2	650	8,8	205,7
7	5,9	16,2	4,7	587,5	7	141,8
7,5	6	12	3,5	437,5	5,5	82,5
<i>Lentinus edodes</i> 182						
3	3,2	4,5	2,5	312,5	3	16,9
4	3,3	7	3	375	6,5	56,8
5	3,4	10	4,7	587,5	7	87,5
6	3,5	10,5	4,8	600	7,2	94,5
6,5	3,6	10	4	500	6,5	81,2
7	3,7	9	3,5	437,5	5,3	59,6
7,5	4	8	2,7	337,5	4,8	48

Примечание. Длительность культивирования 8 сут.

Как показали исследования, грибы р. *Lentinus* могут расти в широком диапазоне начальных значений рН от 3 до 9 (табл. 65). Оптимальное значение рН для выхода биомассы и экзополисахаридов изученных видов р. *Lentinus* на полусинтетической среде составляет 5-6, а на пивном сусле – 4-5.

Таблица 65. Влияние исходного значения рН на рост и синтез полисахаридов грибов р. *Lentinus* при глубинном культивировании на оптимизированных по составу питательных средах

рН		Биомасса, г/л	Экзополисахариды,		Эндополисахариды, %
исходный	конечный		г/л	г/г а.с.б.	
<i>L. edodes</i> 182					
3	3,2	4,5	2	0,44	3
4	3,3	7	3	0,43	3,3
5	3,4	10,5	4,7	0,45	3,7
6	3,5	11	5,2	0,47	4
7	3,6	10	4,3	0,43	3,5
8	3,7	8	3,5	0,44	3,4
9	4	6,3	2,7	0,43	3,2
<i>L. lepideus</i> 1					
3	3,2	6,3	1	0,16	7
4	3,3	7,7	1,3	0,17	7,8
5	3,4	11	2	0,18	8,7
6	3,5	12,4	2,4	0,21	10,2
7	3,6	10,8	2,2	0,2	8,4
8	3,7	9,2	1,5	0,16	8,2
9	4	6,5	1	0,15	7,5
<i>L. tigrinus</i> 1					
3	3,2	7,4	1,4	0,19	6,2
4	3,3	11,5	2,4	0,21	6,5
5	3,4	13	3,7	0,28	7
6	3,5	13,5	4	0,3	8,4
7	3,6	12,8	3,6	0,28	6,8
8	3,7	11,5	3	0,26	6,5
9	4	7,6	2	0,26	6,2

У большинства видов грибов максимальный выход биомассы и полисахаридов наблюдается при одной и той же температуре: у грибов р. *Trametes* при 28-30 °С (Горшина и др., 2003), у *L. edodes* и *Phellinus linteus* при 22-25 °С (Пучкова и др., 2000), у *G. lucidum* и *Ph. gilvus* при 30 °С (Гарибова и др., 2003; Roberts et al., 2001; Hwang et al., 2003). У *Auricularia polytricha* лучший рост отмечен при 20 °С, а образование экзополисахаридов – при 30 °С (Yang et al., 2002).

Оптимальной для роста грибов р. *Lentinus* и образования ими экзо- и эндополисахаридов оказалась температура 25 °С (рис. 44).

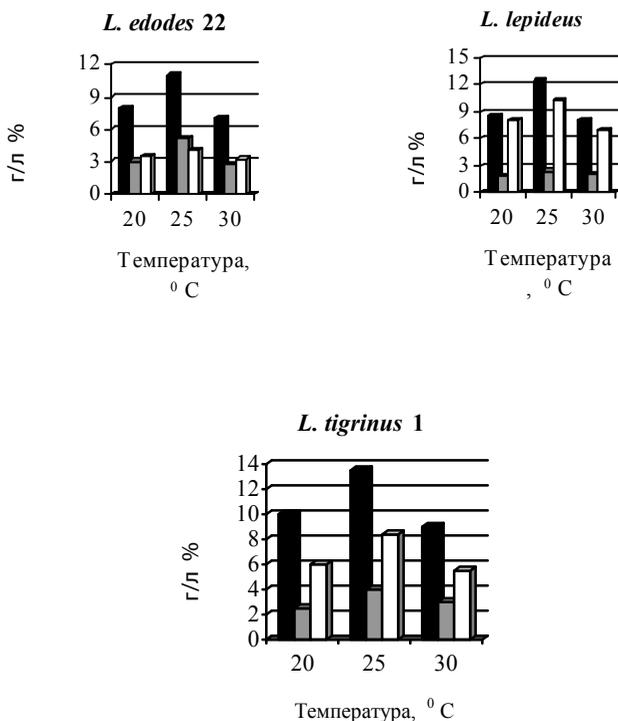


Рис. 44. Влияние температуры культивирования на рост и образование полисахаридов грибами р. *Lentinus*: ■ – биомасса, г/л; ▒ – экзополисахариды, г/л; □ – эндополисахариды, %

Оптимальной для роста и образования эндополисахаридов грибами *G. lucidum* 16 была температура 27-30 °С, *C. shevczenkovi* 25-30 °С (рис. 45, а, б). Синтез экзополисахаридов у этих видов происходит при более широком диапазоне температур.

От насыщенности среды кислородом зависит клеточный рост, морфология клеток, поступление питательных веществ, биосинтез метаболитов (Fang et al., 2002; Zhong et al., 2002; Tang, Zhong, 2002a, b, 2003).

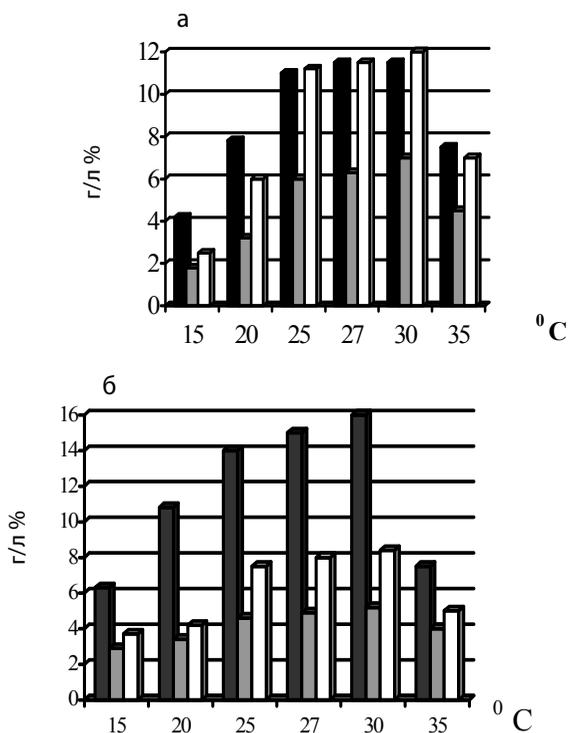


Рис. 45. Влияние температуры на рост и образование полисахаридов грибами *Ganoderma lucidum* 16 (а) и *Crinipellis shevczenkovi* 43 (б). ■ – биомасса, г/л; ■ – экзополисахариды, г/л; □ – эндополисахариды, %

Аэрация в зависимости от биологических особенностей вида и штамма может уменьшать, увеличивать или не оказывать влияния на продукцию полисахаридов. При культивировании

некоторых видов грибов повышение аэрации приводит к увеличению скорости роста и уменьшению продукции экзополисахаридов (Raw et al., 1992). Когда парциальное давление кислорода в культуральной жидкости снижалось почти до нуля, в условиях лимитации кислорода подавлялся рост гриба, увеличивалось накопление глюкана.

Влияние аэрации на рост видов р. *Lentinus* изучали, варьируя уровень массообмена за счёт изменения объёма питательной среды в колбах объемом 500 мл. Скорость растворения кислорода в среде определяли сульфитным методом. Как видно из табл. 66, повышение аэрации способствовало увеличению биомассы и содержания полисахаридов. Наибольший выход мицелия достигается при более высокой, экзополисахаридов – при более низкой аэрации.

Таблица 66. Влияние интенсивности аэрации на рост видов р. *Lentinus* и образование полисахаридов

Объём среды в колбе, мл	Скорость растворения кислорода, гО ₂ /л·ч	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, г/л
			г/л	г/г а.с.б.	
<i>L. edodes</i> 182					
50	0,55	11,5	4,8	0,42	4,2
100	0,325	11,2	5	0,45	4
150	0,21	11	5,2	0,47	4
200	0,155	10,8	5,4	0,5	3,2
250	0,13	8,5	5,5	0,65	3
300	0,115	6	5,3	0,9	2,8
<i>L. lepideus</i> 1					
50	0,55	12	1,6	0,13	9
100	0,325	12,7	2	0,17	10,2
150	0,21	12,4	2,4	0,21	10,1
200	0,155	11	2,5	0,23	8,6
250	0,13	9,5	2,5	0,26	8
300	0,115	7,4	2,7	0,36	7,4
<i>L. tigrinus</i> 1					
50	0,55	14,4	3,7	0,26	7,8
100	0,325	14	3,9	0,28	8,2
150	0,21	13,5	4	0,3	8,2
200	0,155	13	4,2	0,32	6,8
250	0,13	10,5	4,4	0,42	6,5
300	0,115	8	4,5	0,56	6

На процесс погружённого культивирования *G. lucidum* 16 большое влияние также оказывали условия аэрации, интенсивность которой определяли, варьируя уровень массообмена за счёт изменения объёма питательной среды в колбах (от 50 до 300 мл/600 мл). Максимальная биомасса (10,5-10,8 г/л) и наибольшее содержание эндополисахаридов (8,5-8,8%), как и при культивировании видов р. *Lentinus*, наблюдались при высокой степени аэрации (0,55-0,21 г О₂/л·ч) (Babitskaya et al., 2003). Самый высокий выход экзополисахаридов (5,5-6 г/л) отмечен при более низкой аэрации – 0,155-0,13 г О₂/л·ч (табл. 67).

Таблица 67. Влияние интенсивности аэрации на рост *Ganoderma lucidum* 16 и образование полисахаридов

Объём среды в колбе, мл	Скорость растворения кислорода, гО ₂ /л·ч	Биомасса, г/л	Экзополисахариды		Эндополисахариды, г/л
			г/л	г/г а.с.б.	
50	0,55	10,8	4,8	0,44	8,8
100	0,325	10,5	5	0,47	8,6
150	0,21	10	5,4	0,54	8,5
200	0,155	9,2	5,5	0,6	8,2
250	0,13	7,5	6	0,8	7,7
300	0,115	5,4	4	0,74	6,8

При таких же значениях аэрации штамм *L. edodes* 182 образовывал наибольшее количество экзополисахаридов. Самое высокое содержание в биомассе этого штамма эндополисахаридов отмечено при более высокой аэрации – 0,55-0,21 г О₂/л·ч (Babitskaya et al., 2004) (табл. 66).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при выращивании всех исследуемых видов грибов в колбах с различным количеством среды максимальная биомасса (11,3-19,2 г/л) накапливалась при высокой степени аэрации 0,555-0,325 г О₂/л·ч.

Однако наибольшая продуктивность биосинтеза полисахаридов у большинства изученных видов грибов отмечена при менее интенсивной аэрации – 0,13-0,325 г О₂/л·ч (табл. 68).

При этом показатели интенсивности аэрации для достижения максимального содержания полисахаридов и наивысшей продуктивности биосинтеза полисахаридов иногда не совпадают (табл. 68). Но максимум продуктивности грибов по эндополисахаридам сдвигается в сторону большей аэрации.

Таблица 68. Влияние аэрации на образование биомассы и продуктивность биосинтеза полисахаридов различными видами грибов

Объём среды, мл	Скорость растворения кислорода, г O ₂ /л·ч	Биомасса, г/л	Экзополисахариды, г/л	Продуктивность биосинтеза экзополисахаридов, мг/л·сут	Эндополисахариды, % биомассы	Продуктивность биосинтеза эндополисахаридов, мг/л·сут
<i>Ganoderma lucidum</i> 16						
30	0,71	10	4,5	625	6,7	92,1
50	0,55	12,5	5,4	675	8,5	132,8
100	0,325	11,8	7	875	10	147,5
150	0,21	11,5	6,5	812,5	12,8	184
200	0,155	7,5	5,2	650	12,5	117,2
250	0,13	6	5	625	10,2	76,5
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43						
30	0,71	15	3	375	5,6	105
50	0,55	19,2	3,9	487,5	6,5	156
100	0,325	19	5,2	650	9	213,8
150	0,21	18,5	5,6	700	8,8	203,5
200	0,155	10,6	5,1	637,5	7	92,7
250	0,13	8	3,2	400	5,6	56

Уровень аэрации (без перемешивания) существенно влиял на накопление биомассы и образование полисахаридов. Так, при аэрации 0,5 л/л-мин биомасса не превышала 8,7 г/л, содержание эндополисахаридов достигало 11,5%, экзополисахаридов – 9,3 г/л (рис. 46). Повышение аэрации до 1 л/л-мин способствовало более активному росту гриба – биомасса составила 9,5 г/л, эндополисахариды – 12,2%, экзополисахариды – 9,7 г/л. При увеличении аэрации до 1,5 л/л-мин накопление биомассы достигало большего значения (11 г/л),

однако содержание полисахаридов в биомассе и культуральной среде снижалось (10,6% – эндо- и 8,5 г/л – экзополисахариды). При различных уровнях аэрации рост гриба сопровождался снижением pH культуральной среды и потреблением источника углерода. Содержание лактозы в среде к концу ферментации составило 10-14 г/л.

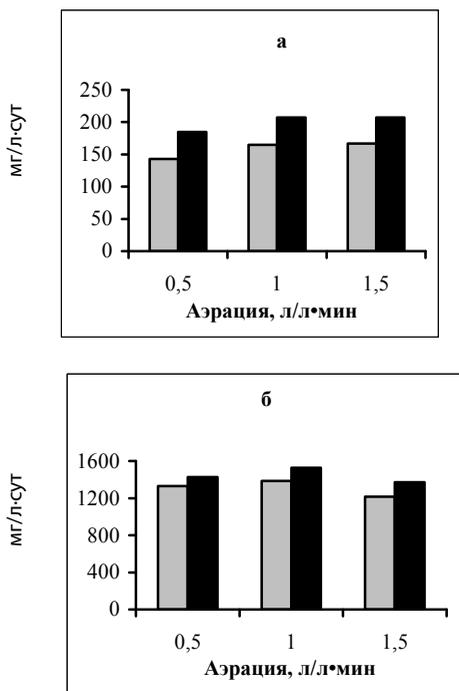


Рис. 46. Продуктивность образования (мг/л·сут) эндо- (а) и экзополисахаридов (б) *Ganoderma lucidum* 16 при культивировании на оптимизированной среде в ферментере:

■ – без перемешивания, ■ – с перемешиванием

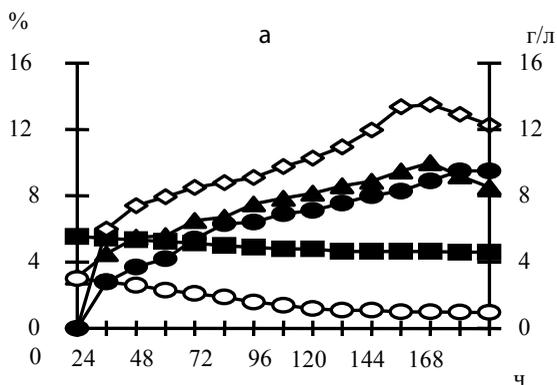
Несколько активизируется процесс выращивания гриба при тех же условиях аэрации с перемешиванием при 100 об/мин (рис. 47). Биомасса достигает 12 г/л, содержание полисахаридов в биомассе 14%, в культуральной среде 10,7 г/л. Однако при проведении культивирования без перемешивания и с

перемешиванием сохраняется общая закономерность: большее количество биомассы накапливается при более высокой аэрации, большее количество полисахаридов – при меньшей.

Увеличение аэрации до 2 л/л мин и более при перемешивании 100 об/мин и выше сопровождается обильным пенообразованием и измельчением гиф гриба, что приводит к плохой фильтрации и затрудняет процесс получения самого мицелия. При низком уровне аэрации с перемешиванием среда из-за большого количества полисахаридов становится вязкой, что также затрудняет процесс фильтрации.

Оптимальное соотношение между ростом гриба, образованием полисахаридов и технологическими параметрами стадии выделения конечного продукта достигается при аэрации 1-1,5 л/л мин и перемешивании 100 об/мин. При этих параметрах отмечена максимальная продуктивность биосинтеза полисахаридов (рис. 47).

Существенное влияние на образование полисахаридов могут оказывать осморегуляторы. Величина осмотического давления среды существенно влияет на физиологические процессы, протекающие в клетке. При этом может изменяться соотношение отдельных компонентов в общем фонде клеточных метаболитов. Повышение осмотического давления среды с внесением KCl, NaCl или сахарозы стимулирует образование полисахаридов (Hwang et al., 2003).



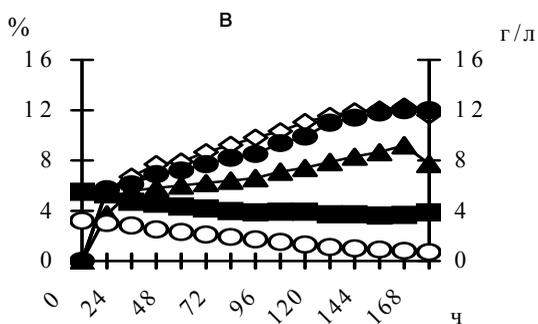
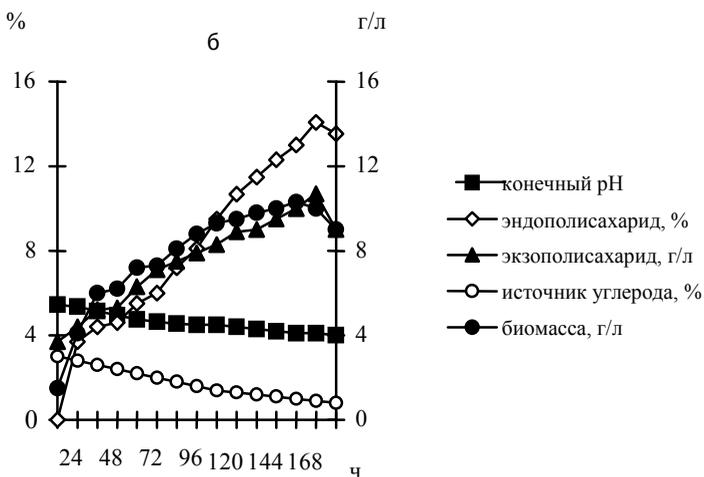


Рис. 47. Динамика роста *Ganoderma lucidum* 16 при культивировании на оптимизированной среде в ферментере при различных режимах аэрации: а – 0,5; б – 1; в – 1,5 л/л·мин и перемешивании 100 об./мин

Вместе с тем, условия, затрудняющие рост культур, стимулировали образование экзополисахаридов. Возможно, это является защитной функцией, позволяющей культуре сохранить жизнеспособность и защищать клетки от гибели. Что же касается внутриклеточных полисахаридов, то у всех видов

грибов, за исключением *C. shevczenkovi*, отмечается тенденция к их снижению.

Изучение образования физиологически активных соединений видами грибов р. *Lentinus* в динамике в процессе роста на оптимизированной среде показало, что накопление биомассы и экзополисахаридов происходит параллельно, достигая максимума к 6-8 сут роста культуры у *L. lepideus* 1 и *L. tigrinus* 1, к 10-12 сут у *L. edodes* 182 (рис. 48-50).

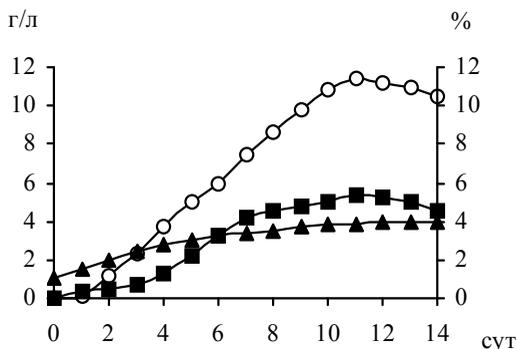


Рис. 48. Динамика роста *Lentinus edodes* 182 при культивировании в ферментере на оптимизированной полусинтетической среде:

○ – биомасса, г/л; ■ – экзополисахариды, г/л;
▲ – эндополисахариды, %

Что же касается эндополисахаридов, то наибольшее их количество отмечалось в стационарной фазе культивирования грибов (рис. 48-50). Активное потребление глюкозы начинается с первых суток, а к концу ферментации остаётся не более 0,5-2 г/л источника углерода. Удельная скорость роста грибов (μ) составляла для *L. edodes* 182 $0,010 \text{ ч}^{-1}$, для *L. lepideus* 1 – $0,020 \text{ ч}^{-1}$ и для *L. tigrinus* 1 – $0,025 \text{ ч}^{-1}$; продуктивность биосинтеза экзополисахаридов: 550, 300 и 500 мг/л-сут, продуктивность биосинтеза эндополисахаридов: 40, 170 и 140 мг/л-сут соответственно.

Исследование роста *G. lucidum* 16 в динамике при культивировании в ферментере на оптимизированной питательной

среде показало, что активный рост биомассы наблюдается в экспоненциальной фазе роста гриба, наибольшее образование эндо- и экзополисахаридов – в стационарной фазе, достигая максимума к 6-8 суткам роста культуры (рис. 51).

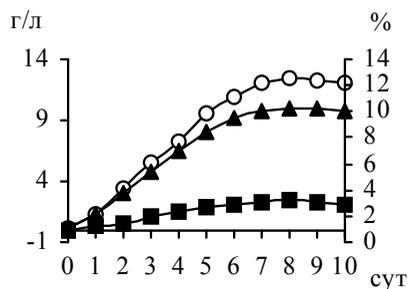


Рис. 49. Динамика роста *Lentinus lepideus* 1 при культивировании в ферментере на оптимизированной полусинтетической среде:

○ – биомасса, г/л; ■ – экзополисахариды, г/л;
▲ – эндополисахариды, %

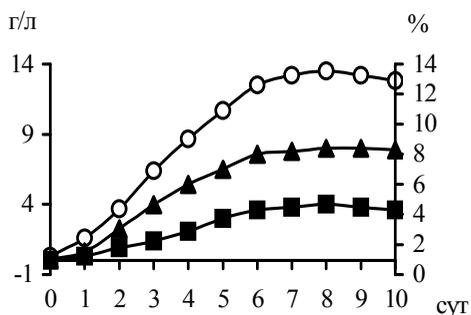


Рис. 50. Динамика роста *Lentinus tigrinus* 1 при культивировании в ферментере на оптимизированной полусинтетической среде:○ – биомасса, г/л; ■ – экзополисахариды, г/л;

▲ – эндополисахариды, %

Удельная скорость роста гриба (μ) составляла $0,02 \text{ ч}^{-1}$, продуктивность биосинтеза экзополисахаридов: $550 \text{ мг/л}\cdot\text{сут}$; продуктивность биосинтеза эндополисахаридов – $150 \text{ мг/л}\cdot\text{сут}$ соответственно.

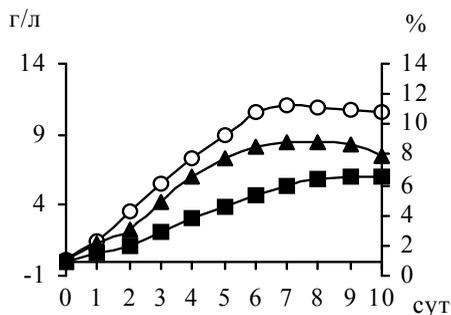


Рис. 51. Динамика роста *Ganoderma lucidum* 16 при культивировании в ферментере на оптимизированной полусинтетической среде:

○ – биомасса, г/л; ■ – экзополисахариды, г/л;
▲ – эндополисахариды, %

Таким образом, оптимальными условиями для роста *G. lucidum* 16 – продуцента полисахаридов были: температура 26-28 °С, pH 6-6,5, аэрация 0,21-0,55 гО₂/л·ч. Наибольший выход мицелия достигается при более высокой, полисахаридов – при более низкой аэрации.

Количественная оценка влияния оптимизации питательной среды на эффективность процесса роста и биосинтеза полисахаридов отобранных видов и штаммов грибов свидетельствует о том, что при выращивании на оптимизированных синтетических питательных средах в ферментерах АК-10 при аэрации 0,5 л/л среды в минуту, непрерывном перемешивании при частоте вращения мешалки 100 об/мин (количество посевного материала – 10% по объёму) накопление биомассы и экзополисахаридов происходит параллельно. Биомасса достигает максимума к 132-156 ч, содержание экзополисахаридов – к 120-144 ч, т.е. в стационарной фазе роста грибов, содержание эндополисахаридов – к 72-84 ч в экспоненциальной фазе роста (табл. 69). С 60-72 ч роста грибов наблюдается интенсивное потребление источника углерода и закисление питательной среды. После перехода в стационарную фазу концентрация биомассы незначительно снижается, pH среды остаётся на

одном уровне. Остаточное содержание глюкозы и лактозы составляет 0,7-0,9%. Скорость потребления источника углерода (Y) *C. schevczenkovi* и *G. lucidum* достигает максимальных величин к 60-72 ч, затем становится практически постоянной, что связано, очевидно, с резким падением удельной скорости роста грибов (μ) и замедлением скорости образования полисахаридов. ЭК использования источника углерода на биосинтез экзополисахаридов составил 26,3-45%, эндополисахаридов – 7-11,8%. Продуктивность процесса биосинтеза полисахаридов (П) *C. schevczenkovi* и *G. lucidum*, соответственно, 28,7-55 (экзо-) и 8,2-16,8 мг/г·ч (эндополисахариды). При этом П *G. lucidum* намного выше *C. schevczenkovi*, содержание полисахаридов в культуральной жидкости и биомассе этого гриба также выше. Удельная скорость образования полисахаридов (Z) *C. schevczenkovi* и *G. lucidum* составила 0,036-0,055 ч⁻¹ (экзо-) и 0,01-0,025 ч⁻¹ (эндополисахариды), скорость образования (X) – 91,6 и 83,3 мг/л·ч (экзо-) и 32,9-56,5 мг/л·ч (эндополисахариды) (табл. 69).

Сравнение полученных результатов показало, что продуктивность процесса биосинтеза (в момент максимального образования биомассы) как экзо-, так и эндополисахаридов у *G. lucidum* 16 значительно выше, чем у *C. schevczenkovi* 43. Намного выше у этого вида гриба и ЭК использования источника углерода на биосинтез полисахаридов.

Оптимизация питательных сред и условий культивирования позволили повысить количество синтезируемых грибами экзополисахаридов на 43,7-57,5%, эндополисахаридов – на 17,6-25,45% (табл. 70). Оптимизация состава питательной среды и параметров культивирования исследуемых видов оказали наибольшее влияние на процессы биосинтеза экзополисахаридов.

Сравнительный анализ полученных нами результатов с литературными данными (Tang, Zhong, 2002a, b) показал, что отобранные штаммы по важнейшим показателям сопоставимы с зарубежными аналогами или даже превосходят их (табл. 71).

Таблица 69. Эффективность процесса роста и биосинтеза полисахаридов различными видами грибов при культивировании в ферментере на оптимизированной питательной среде

Кинети- ческие пара- метры	Время культивирования, ч													
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168
<i>Ganoderma lucidum</i> 16														
Y, г/л·ч	0,04	0,08	0,21	0,23	0,28	0,3	0,27	0,18	0,08	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04
П (экзо-), мг/г·ч	25	23	55	55	48	45,0	42	38	40	38	32	32	31	32
П (эндо-), мг/г·ч	1,33	3,58	5,41	6,83	12,83	16,08	15,41	12,93	10,83	10,08	9,58	9,16	8,83	8,33
ЭК (экзо-), %	-	30	45	38,8	35	33,08	28,57	25,78	25	24,87	23,07	21,86	20,9	20
ЭК (эндо-), %	-	5,16	4,38	4,89	9,24	11,77	10,45	8,57	6,63	6,49	6,9	6,24	5,87	5,11
X (экзо-), мг/л·ч	-	16	50	66,6	75	83,3	25	8,3	8,3	8,3	-	-	-	-
X(эндо-), мг/л·ч	-	5,11	8,17	12,7	49,66	56,50	12,91	-	-	-	-	-	-	-
Z (экзо-), ч ⁻¹	0,07	0,02	0,055	0,051	0,037	0,036	0,021	0,008	-	-	-	-	-	-
Z (эндо-), ч ⁻¹	-	0,06	0,009	0,009	0,024	0,025	0,011	-	-	-	-	-	-	-
μ, ч ⁻¹	-	-	0,033	0,032	0,033	0,027	0,011	0,008	-	-	-	-	-	-

<i>Crinipellis schevzenkovi</i> 43														
У, г/л · ч	0,125	0,183	0,15	0,208	0,336	0,25	0,15	0,116	0,108	0,07	0,07	0,07	0,06	0,03
П (экзо-), мг/г·ч	-	30	24,12	28,68	26,93	26,98	25,64	24,93	26,31	27,57	27,58	27,41	27,41	26,04
П (эндо-), мг/г·ч	-	3,66	4,23	6,5	7,33	7,75	8,16	7,33	6,66	6,41	6,25	6,00	5,83	5,53
ЭК (экзо-), %	-	24,3	20	26,25	25,80	22,07	20,93	20,43	21,1	22,11	22,53	22,52	21,17	21,36
ЭК (эндо-), %	-	2,97	3,5	5,95	7,02	6,34	6,66	6	5,34	5,14	5,1	4,92	4,71	4,58
Х (экзо-), мг/л·ч	-	33,3	16,6	83,3	91,66	16,6	16,6	16,6	33,3	33,3	16,6	16,6	25	-
Х (эндо-), мг/л·ч	-	5,1	6,91	23,58	32,93	8,77	14,17	-	-	-	-	-	-	-
Z (экзо-), ч ⁻¹	-	0,025	0,013	0,036	0,024	0,027	0,013	0,016	0,055	0,055	0,027	0,023	0,027	-
Z (эндо-), ч ⁻¹	-	0,004	0,005	0,01	0,009	0,014	0,012	-	-	-	-	-	-	-
ц, ч ⁻¹	-	0,061	0,045	0,048	0,031	0,004	0,009	0,006	-	-	-	-	-	-

Таблица 70. Влияние оптимизации питательной среды и условий культивирования на биосинтез полисахаридов различными видами грибов

Вид, штамм	Экзополисахариды			Эндополисахариды		
	до оптимизации, г/л	после оптимизации, г/л	% увеличения	до оптимизации, % биомассы	после оптимизации, % биомассы	% увеличения
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	4,0	6,3	57,5	8,5	10,0	17,6
<i>Lentinus edodes</i> 182	3,2	4,8	50,0	5,5	6,9	25,45
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	3,2	4,6	43,7	6,6	8,1	22,7

Изучение состава экзо- и эндополисахаридов *Ganoderma lucidum*, *Crinipellis schevczenkovi* и *Lentinus edodes* на оптимизированной питательной среде

Установлено, что оптимизация условий образования полисахаридов не оказывала существенного влияния на их углеводный состав. Как при выращивании грибов на контрольной среде, так и на оптимизированных питательных средах экзо- и эндополисахариды являлись гетерогликанами с основным мономером – глюкозой. Полисахариды, образуемые *C. schevczenkovi* 43, представлены галактозой и глюкозой (табл. 72).

Полисахариды *G. lucidum* 16 оказались гетерогликанами, состоящими из глюкозы, галактозы и незначительных количеств маннозы (табл. 73). Выращивание этого штамма на оптимизированной среде приводило к снижению галактозы в экзополисахаридах и увеличению её в 2 раза в эндополисахаридах. Повышение содержания галактозы отмечено и в экзополисахаридах *L. edodes* 182 при выращивании его на оптимизированной среде (табл. 72).

Таблица 71. Продуктивность процесса роста *Ganoderma lucidum* 16 и *Crinipellis schevczenkovi* 43 в ферментерах на оптимизированной питательной среде в сравнении с литературными данными

Параметр	<i>G. lucidum</i> 16	<i>C. schevczenkovi</i> 43	Литературные данные для <i>G.</i> <i>lucidum</i> (Tang, Zhong, 2002a, b)
Средняя скорость роста, г/л сут	2,27	2,14	1,6
Выход биомассы, г/г источника углерода	0,51	0,68	0,39
Выход экзополи- сахаридов, г/л	9	7,5	0,53
П биосинтеза экзополисаха- ридов, мг/л-сут	1285,7	1071,4	48
Выход эндополи- сахаридов, г/л	1,35	1,1	1,43
П биосинтеза эндополисаха- ридов, мг/л-сут	185,7	160,7	142
Выход эндополи- сахаридов, мг/100 мг сух. биомассы	13,7	7,3	12,3

Свободные углеводы цитозоля глубинного мицелия грибов

Исследование спирторастворимой фракции в мицелии изучаемых видов при глубинном культивировании показало, что наибольшее ее содержание зафиксировано у *C. schevczenkovi* 43, у *L. edodes* 182 и *G. lucidum* 16 ее количество в 2-3,5 раза меньше (табл. 74). Основная часть данной фракции у всех исследованных видов грибов представлена полиолами. Преобладающим среди полиолов оказался маннит. В отличие от *G. lucidum* 16, арабит в составе полиол *C. schevczenkovi* 43 и *L. edodes* 182 является минорным компонентом (табл. 74).

Из представленных в табл. 74 данных следует, что для каждого из исследуемых видов грибов характерен определенный состав углеводов. Для *C. schevczenkovi* 43 и *L. edodes* 182 – глюкоза, манноза, трегалоза, для *G. lucidum* 16 – глюкоза и трегалоза. Характерной особенностью углеводного состава *G. lucidum* 16 является отсутствие в спирторастворимой фракции цитозоля маннозы (табл. 74).

Таблица 72. Влияние оптимизации питательной среды на углеводный состав полисахаридов *Crinipellis schevczenkovi* 43 и *Lentinus edodes* 182

Углевод, % в полисахари- де	<i>C. schevczenkovi</i> 43		<i>L. edodes</i> 182	
	до оптими- зации	после оптимизации	до оптими- зации	после оптимизации
Экзополисахариды				
Манноза	-	-	3,19	1,62
Галактоза	5,27	5,3	4,24	7,68
Глюкоза	94,73	94,7	92,57	90,7
Итого	100	100	100	100
Эндополисахариды				
Манноза	сл.	сл.	сл.	сл.
Галактоза	4,54	3,89	6,25	5,97
Глюкоза	95,46	96,11	93,75	94,03
Итого	100	100	100	100

Исследование количественного и качественного состава углеводов водорастворимой фракции цитозоля грибов показало: наибольшее количество водорастворимых сахаров, как и спирторастворимых, обнаружено у *C. schevczenkovi* 43, наименьшее – у *G. lucidum* 16 (табл. 74, 75). Основная часть данной фракции у всех видов грибов представлена полиолами. Отличия между сахароспиртами у изученных видов базидиомицетов не имеют качественных изменений, основным полиолом, как и для спирторастворимой фракции, оказался маннит (табл. 75).

Как и в спирторастворимой, в водорастворимой фракции цитозоля *C. schevczenkovi* 43 и *G. lucidum* 16 обнаружены глюкоза и

трегалоза, *L. edodes* 182 – глюкоза, трегалоза и манноза (табл. 75). Сравнительный анализ водо- и спирторастворимых фракций не выявил различий в количественном и качественном составе углеводов. Наличие в обеих фракциях углеводных протекторов (маннит, арабит, трегалоза) указывает на целесообразность использования как спиртовых, так и водных экстрактов грибов для получения энерготоников и лечебно-оздоровительных продуктов (табл. 75).

Таблица 73. Влияние оптимизации питательной среды на углеводный состав полисахаридов *Ganoderma lucidum* 16

Углевод, % в полисахариде	Экзополисахариды	
	до оптимизации	после оптимизации
Манноза	1,75	2,25
Галактоза	10,05	8,35
Глюкоза	88,2	89,4
Итого	100	100
Манноза	1,5	2,33
Галактоза	6,02	12,83
Глюкоза	92,48	84,84
Итого	100	100

Кроме спирто- и водорастворимых сахаров в цитозоле клетки содержатся водорастворимые полисахариды. Как следует из данных табл. 76, наибольшее содержание свободных полисахаридов, извлекаемых водой (структурно-функциональных), характерно для *G. lucidum* 16. Газохроматографический анализ гидролизатов полисахаридов позволил установить наличие в них глюкозы, галактозы и маннозы, причем глюкоза составляла основную часть углеводов. Манноза обнаруживалась в следовых количествах у всех изученных видов грибов, за исключением *L. edodes* 182 (табл. 76).

Таблица 74. Углеводный состав спиртовых фракций глубинного мицелия различных видов грибов

Вид, штамм	Спиртовая фракция, % сухой биомассы	Полиолы, % сухой биомассы	Полиолы, % суммы		Сахара, % сухой биомассы	Сахара, % суммы		
			Арабит	Маннит		Глюкоза	Манноза	Трегалоза
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	12,11	7,11	4,5	95,5	5	54,80	1,00	44,20
<i>Lentinus edodes</i> 182	5,74	3,61	1,7	98,3	2,13	70,40	1,20	28,40
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	3,71	2,66	21,8	78,2	1,05	61,90	-	38,10

Таблица 75. Углеводный состав водорастворимых фракций глубинного мицелия различных видов грибов

Вид, штамм	Водная фракция, % сухой биомассы	Полиолы, % сухой биомассы	Полиолы, % суммы		Сахара, % сухой биомассы	Сахара, % суммы		
			Арабит	Маннит		Глюкоза	Манноза	Трегалоза
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	13,33	7,83	2,8	97,2	5,5	58,20	сл.	41,80
<i>Lentinus edodes</i> 182	5,15	3,05	2,1	97,9	2,1	76,85	2,20	20,95
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	3,01	2,25	9,4	90,6	0,76	51,31	-	48,69

Таблица 76. Углеводный состав фракции водорастворимых полисахаридов глубинного мицелия различных видов грибов

Вид, штамм	Содержание полисахаридов, % сух. биомассы	Углеводы, % в полисахаридах		
		Глюкоза	Манноза	Галактоза
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	3,2	80,85	сл.	19,15
<i>Lentinus edodes</i> 182	4,3	73,33	10,25	16,42
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	7,8	93,57	-	6,43

Структурные полисахариды клеточной стенки

Наряду со свободными углеводами в состав мицелия входят структурные компоненты клеточной стенки – хитин-глюкановый комплекс. Фракционирование его позволило получить кислоторастворимую, две щелочерастворимых фракции и хитин.

Как следует из данных табл. 77, у исследованных видов грибов преобладает кислоторастворимая фракция. Анализ углеводного состава данной фракции показал наличие в ней глюкозы, галактозы и маннозы. И если изучаемые виды грибов *C. schevczenkov* 43 и *G. lucidum* 16 практически не отличались по соотношению глюкозы и галактозы, то в кислоторастворимой фракции *L. edodes* 182 наряду с глюкозой и галактозой обнаружена манноза.

Глубинный мицелий *L. edodes* 182 отличался более высоким, чем мицелий *C. schevczenkov* 43 и *G. lucidum* 16, количеством первой щелочной фракции (табл. 77). Самое низкое содержание этой фракции обнаружено у *C. schevczenkovi* 43. В отличие от кислоторастворимой фракции углеводный состав первой щелочерастворимой фракции значительно различался как в качественном, так и в количественном отношении. Так, соотношение глюкозы к галактозе у *C. schevczenkovi* 43 составило 13:1, *G. lucidum* 16 – 1,6:1 и *L. edodes* 182 – 35:1. Наряду с глюкозой и галактозой полисахарид *L. edodes* 182 содержал маннозу (табл. 77).

Таблица 77. Углеводный состав кислотных и щелочных фракций глубинного мицелия различных видов грибов

Вид, штамм	Кислотная				Щелочная I				Щелочная II	
	% сух. биомассы	Манноза, %	Глюкоза, %	Галактоза, %	% сух. биомассы	Глюкоза, %	Манноза, %	Галактоза, %	% сух. биомассы	Глюкоза, %
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	22,23	-	95,1	4,9	1,9	92,8	сл.	7,2	2,8	100
<i>Lentinus edodes</i> 182	9,8	4,69	89,49	5,82	8,5	85,3	12,3	2,4	12,2	100
<i>Ganoderma. lucidum</i> 16	9,8	-	96,14	3,86	2,8	61,76	сл.	38,24	3,74	100

Таким образом, структурные полисахариды клеточной стенки грибов (первая щелочная фракция) являются гетерогликанами. По углеводному составу полисахариды *C. schevczenkovi* 43 и *G. lucidum* 16 – галактоглюканы, тогда как *L. edodes* 182 – галактоманноглюкан.

В отличие от гетерополисахаридов первой щелочной фракции вторая щелочная фракция исследованных видов грибов представлена гомополисахаридом, в частности глюканом (табл. 77). В количественном отношении вторая щелочная фракция значительно превышала первую. Хитин в мицелии исследованных видов грибов составлял 1,4-3,8% сухой биомассы.

На примере двух штаммов – *L. edodes* 182 и *G. lucidum* 16 – исследованы ИК-спектры щелочерастворимых фракций и хитина. Подтверждением тому, что четвертая фракция – это хитин, является ИК-спектр, в котором имеются примерно одинаковые по интенсивности полосы поглощения, характерные для ацетамидной группы хитина в областях 1650 см^{-1} (амид I) и 1550 см^{-1} (амид II) (рис. 52).

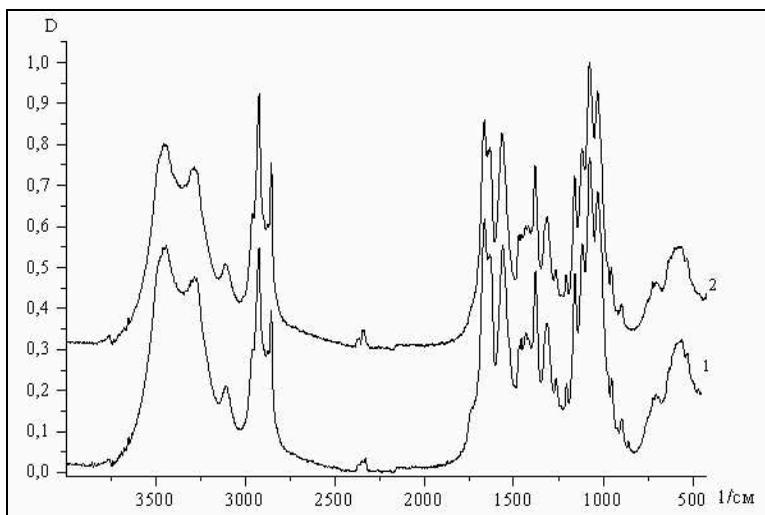


Рис. 52. ИК-спектр хитина: 1 – *Ganoderma lucidum* 16; 2 – *Lentinus edodes* 182

ИК-спектры щелочерастворимых фракций, отличаясь от спектра хитина, имели большое сходство между собой (рис. 53, 54) и характеризовались интенсивными полосами поглощения в области $1100-1000\text{ см}^{-1}$, характерными для класса углеводов в целом (Елинов, 1989). Известно, что полисахариды являются для ИК-спектроскопии одним из самых трудных объектов вследствие большого числа ОН- и СН-групп и других особенностей (Елинов, 1989). В то же время ИК-спектры могут дать ценную информацию о строении полисахаридов. Так, полоса поглощения в области 890 см^{-1} характерна для β -гликозидной, а в области 844 см^{-1} – для α -гликозидной связей.

В отличие от ИК-спектра четвертой фракции, имеющей только четкий пик, характерный для β -гликозидной связи хитина (рис. 52), спектры щелочерастворимых фракций имели полосы поглощения слабой интенсивности в области 840 и 890 см^{-1} , что позволило предположить наличие α - и β -связей (рис. 53, 54).

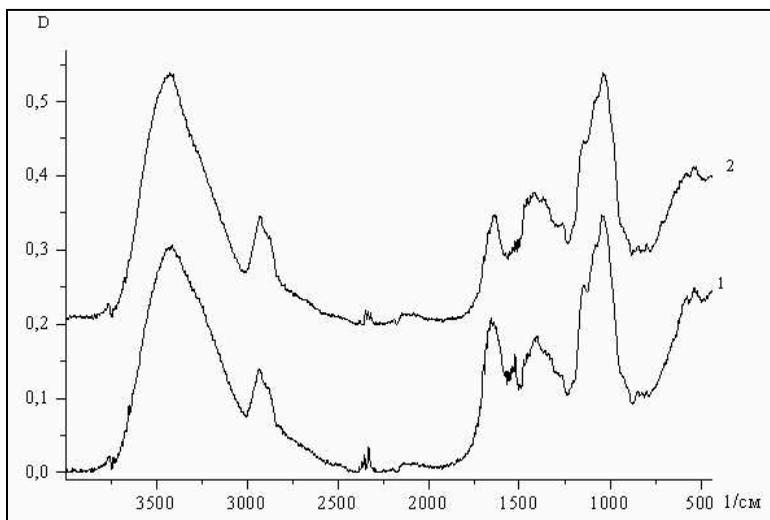


Рис. 53. ИК-спектр первой щелочерастворимой фракции:
1 – *Ganoderma lucidum* 16; 2 – *Lentinus edodes* 182

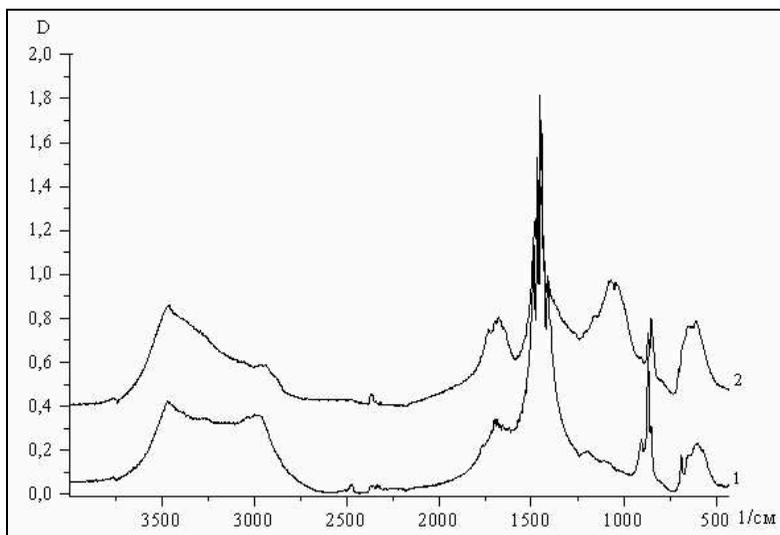


Рис. 54. ИК-спектр второй щелочерастворимой фракции:
1 – *Ganoderma lucidum* 16; 2 – *Lentinus edodes* 182

На основании полученных данных по углеводному составу и ИК-спектроскопии структурные полисахариды первой щелочной фракции можно отнести к гетерогликанам с β - и α -гликозидным типом связи, а второй щелочной фракции – к гомогликанам с аналогичным типом связей.

Для всех исследованных видов грибов характерно преобладание структурных полисахаридов. В мицелии *C. schevczenkovi* 43 их было в 2 раза больше, чем углеводов цитозоля, в мицелии *L. edodes* 182 – в 3 раза, в мицелии *G. lucidum* 16 – в 2,4 раза (табл. 78). Мицелий *C. schevczenkovi* 43 содержал наибольшее количество свободных углеводов цитозоля и структурных полисахаридов по сравнению с остальными изученными видами грибов (табл. 78).

Такая же закономерность характерна для содержания водорастворимых углеводов цитозоля и кислотной фракции структурных полисахаридов в биомассе *C. schevczenkovi* 43. Самые высокие показатели количества полисахаридов в углеводах цитозоля и хитина имел мицелий *G. lucidum* 16 (табл. 78).

Таблица 78. Фракционный состав углеводов мицелия различных видов грибов

Вид, штамм	Углеводы цитозоля, % сухой биомассы			Содержание структурных полисахаридов во фракциях, % сухой биомассы					Общее содержание углеводов, %
	Водный экстракт	Полисахариды	Всего	Кислотная	Щелочная I	Щелочная II	Хитин	Всего	
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	25,44	3,2	28,64	22,23	1,9	2,8	2	28,93	57,57
<i>Lentinus edodes</i> 182	10,89	4,27	15,16	9,8	8,5	12,2	2,2	32,7	47,86
<i>Ganoderma. lucidum</i> 16	6,72	7,8	14,52	9,8	2,8	3,74	3,8	20,14	34,66

Таблица 79. Фракционный состав углеводов плодовых тел и глубинного мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus*

Плодовые тела									
Штамм	Углеводы цитозоля, % сухой биомассы			Содержание структурных полисахаридов во фракциях, %					Общее содержание углеводов, %
	Водный экстракт	Полисахариды	Всего	Кислотная	Щелочная I	Щелочная II	Хитин	Всего	
5	21,5	4,5	26	10,3	8,2	12,8	4,7	36	62
10	22,7	4,2	26,7	8,8	9,5	11	4,8	34,1	60,8

Глубинный мицелий									
Штамм	Углеводы цитозоля, % сухой биомассы			Содержание структурных полисахаридов во фракциях, %					Общее содержание углеводов, %
	Водный экстракт	Полисахарид	Всего	Кислотная	Щелочная I	Щелочная II	Хитин	Всего	
5	16,5	9	25,5	12,6	5	10	3,7	31,3	56,8
10	13,8	8,5	22,3	11,5	6,2	8,3	3,8	29,8	52,1

Таблица 80. Углеводный состав водорастворимых фракций плодовых тел и глубинного мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus*

Штамм	Водный экстракт, % сухой биомассы	Полиолы, % сухой биомассы	Полиолы, % суммы		Сахара, % сухой биомассы	Сахара, % суммы		
			Арабит	Маннит		Глюкоза	Манноза	Трегалоза
Плодовые тела								
5	21,5	4,8	25	75	16,7	72,5	2,0	25,5
10	22,7	6,2	18,7	81,3	16,5	67,8	1,5	30,7
Глубинный мицелий								
5	16,5	6,9	17	83	9,6	58,8	1,2	40
10	13,8	7,4	21	79	6,4	64	1,3	34,7

Было проведено сравнительное изучение содержания углеводных компонентов в плодовых телах и глубинном мицелии штаммов *Pleurotus ostreatus* (табл. 79). Общее содержание углеводов в глубинном мицелии оказалось несколько ниже, чем в плодовых телах за счет уменьшения доли структурных полисахаридов и углеводов цитозоля (табл. 79). Уменьшилось содержание структурных полисахаридов в щелочных фракциях мицелия (на 20-39%), а также хитина (на 26%). Глубинное культивирование способствует увеличению доли структурных полисахаридов в кислотной фракции и значительному (в 2 раза) повышению в мицелии водорастворимых полисахаридов (Babitskaya et al., 2001) (табл. 79).

Исследование содержания углеводов в водном экстракте показало, что значительная часть его представлена полиолами, при этом в глубинном мицелии содержание полиолов было на 19-40% выше, чем в плодовых телах (табл. 80). Преобладающими среди полиолов оказался маннит. Как для плодовых тел, так и глубинного мицелия обоих штаммов *P. ostreatus* характерен одинаковый состав углеводов: глюкоза, манноза и трегалоза. Характерной особенностью является снижение в составе углеводов глубинного мицелия содержания глюкозы и повышение трегалозы по сравнению с плодовыми телами.

Наряду со свободными углеводами цитозоля в состав мицелия и плодовых тел *P. ostreatus* входят структурные компоненты клеточной стенки – хитинглюкановый комплекс. В результате его фракционирования получены кислоторастворимая фракция, две щелочерастворимых фракции и хитин. Количество кислоторастворимой фракции в плодовых телах несколько ниже, чем в глубинном мицелии. Большее количество I и II щелочерастворимых фракций обнаружено в плодовых телах (табл. 81). Анализ углеводного состава фракций показал, что кислотная фракция плодовых тел состоит из глюкозы и галактозы, глубинного мицелия – из маннозы, глюкозы и галактозы. Различаются по составу углеводов и щелочные фракции. Так, I щелочная фракция плодовых тел состоит из ксилозы, маннозы, галактозы и глюкозы, а глубинного мицелия – только из галактозы и глюкозы.

Таким образом, структурные полисахариды клеточной стенки плодовых тел и глубинного мицелия *P. ostreatus* (кислотная и первая щелочная фракция) оказались гетерогликанами. Напротив, II

щелочная фракция углеводов как плодовых тел, так и глубинного мицелия оказалась гомополисахаридом и, в частности, глюканом (Бабицкая и др., 2005) (табл. 81).

Изучение водорастворимых полисахаридов плодовых тел и глубинного мицелия штаммов *P. ostreatus* (табл. 82) показало, что в составе полисахаридов глубинного мицелия присутствуют глюкоза, галактоза и манноза, а в полисахаридах плодовых тел еще и ксилоза и арабиноза. Содержание глюкозы в полисахаридах глубинного мицелия выше, а количество галактозы и маннозы меньше, чем в полисахаридах плодовых тел (табл. 82). Хроматографический анализ гидролизатов полисахаридов показал, что они являются гетерогликанами, основной мономер их – глюкоза.

Сопоставляя полученные данные с таковыми плодовых тел некоторых видов грибов, необходимо отметить, что общее содержание углеводов в плодовых телах несколько выше, чем в глубинном мицелии. Так, общее содержание углеводов в плодовых телах *L. edodes* составило 58-60% (Wasser, Weis, 1997), *G. lucidum* – 51,3-55,7 (Chen et al., 2001).

Качественный состав углеводов плодовых тел и глубинного мицелия штаммов различных видов грибов практически идентичен. По содержанию структурно-функциональных полисахаридов, обуславливающих лечебно-профилактические свойства, глубинный мицелий в 3-4 раза превосходит плодовые тела.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКЗО- И ЭНДОПОЛИСАХАРИДОВ

Изучение физико-химических свойств экзо- и эндополисахаридов (фракционирование, очистка, растворимость, вязкость, молекулярная масса, угол вращения)

Исследование полисахаридов сопряжено с множеством задач, которые сводятся в основном к фракционированию, очистке, определению качественного и количественного состава мономерных единиц, размеров циклов моносахаридов, входящих в молекулу по-

Таблица 81. Углеводный состав кислотных и щелочных фракций плодовых тел и глубинного мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus*

Штамм	Состав, %										
	Кислотная, % сух. биомассы	Манноза	Глюкоза	Галактоза	Щелочная I, % сух. биомассы	Ксилоза	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Щелочная II, % сух. биомассы	Глюкоза
Плодовые тела											
5	10,3	сл.	95,5	4,5	8,2	5,4	1,5	17,1	76,0	12,8	100
10	8,8	сл.	96,2	3,8	9,5	2,8	3,2	21,0	73,0	11	100
Глубинный мицелий											
5	12,6	2,5	95,0	2,5	5	сл.	сл.	15,4	84,6	10	100
10	11,5	3	92,5	4,5	6,2	сл.	сл.	16,2	83,8	8,3	100

Таблица 82. Углеводный состав фракции водорастворимых полисахаридов плодовых тел и мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus*

Штамм	Содержание полисахаридов, % сухой массы	Углеводы, % в полисахариде				
		Арабиноза	Ксилоза	Манноза	Галактоза	Глюкоза
Плодовые тела						
5	4,5	1,97	5,05	8,8	11,2	72,98
10	4,2	сл.	1,8	14,82	5,98	77,4
15	3,8	сл.	сл.	15,52	сл.	84,48
35	3,2	-	1,54	10,08	4,22	84,16
Глубинный мицелий						
5	9,0	-	-	сл.	1,5	98,5
10	8,5	-	-	1,5	0,5	98
15	7,6	сл.	сл.	1,5	1	97,5
35	6,9	-	-	-	-	100

лимера, мест их соединения, наличие боковых цепей и типов гликозидных связей, конфигурации гликозидных связей, молекулярной массы. Всё это позволяет выяснить первичную структуру полисахарида (Елинов, 1989)°.

Многочисленные методы, разработанные для выделения онкостатических полисахаридов из плодовых тел грибов и мицелия, имеют много общего. Обычно полисахариды из высушенных и измельченных плодовых тел грибов экстрагируют кипячением в воде (100 °С) в течение 12-18 ч, после чего осаждают из супернатанта 40% этанолом.

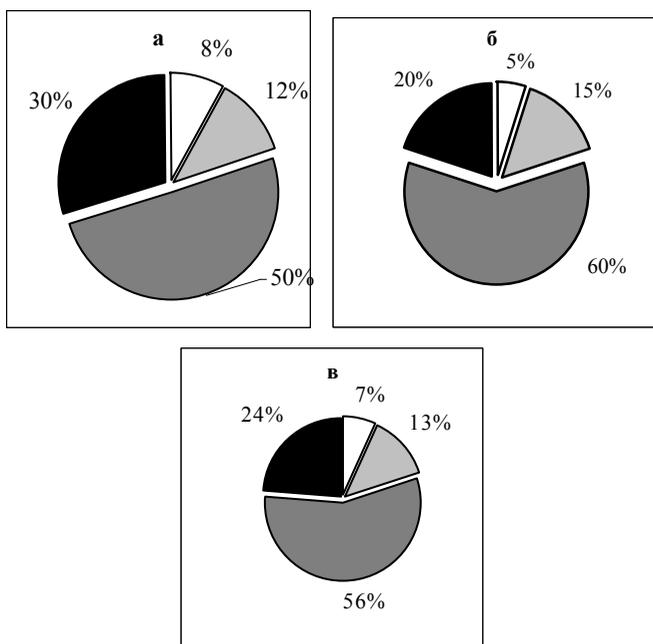


Рис. 55. Растворимость фракций экзополисахаридов *G. lucidum* 16 (а), *Lentinus edodes* 182 (б) и *L. tigrinus* 1 (в): □ – водорастворимая, ■ – щелочерастворимая (1% NaOH), ■ – щелочерастворимая (10% NaOH), ■ – нерастворимый остаток

Существуют различные модификации метода. Начальное фракционирование внеклеточных полисахаридов заключается в осаждении из культуральной жидкости спиртом 1:1, очистки диализом против дистиллированной воды и последующем последовательном растворении в воде, растворах щелочей и диметилсульфоксиде. Дальнейшая очистка полисахаридов достигается комбинацией технологий концентрации этанолом, фракционного осаждения и т.д. (Wasser, 2002).

Исследование растворимости показало, что экзополисахариды изучаемых штаммов не растворялись в неорганических и органических кислотах, органических растворителях (спирт, ацетон, хлороформ и т.д.); при нагревании частично растворялись в дистиллированной воде, лучше – в щелочах и диметилсульфоксиде. Экзополисахариды *L. lepideus* 1 полностью растворялись в дистиллированной воде при нагревании, в отличие от экзополисахаридов *G. lucidum* 16, *L. edodes* 182 и *L. tigrinus* 1. Как следует из данных табл. 83 и рис. 55, содержание водорастворимых полисахаридов у всех исследованных видов примерно одинаково и не превышает 8%.

Наибольшее количество полисахаридов растворялось в 10%-ной щелочи, растворимость экзополисахаридов в 1%-ной щелочи была в 4-8 раз ниже, чем в 10%-ной (табл. 83, рис. 55). Доля растворимых в воде и щелочи экзополисахаридов *L. edodes* 182 и *L. tigrinus* 1 была в 1,5-2 раза выше, чем растворимых экзополисахаридов *S. schevczenkovi* 43 и *G. lucidum* 16.

Таблица 83. Содержание фракций в экзополисахаридах различных видов грибов, %

Фракция	<i>Ganoderma lucidum</i> 16	<i>Lentinus edodes</i> 182	<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43
Водорастворимая	7,8	5,8	7,4
Щелочерастворимая (1% NaOH)	11,8	14,9	5,3
Щелочерастворимая (10% NaOH)	50,4	60,9	42,9
Нерастворимый остаток	30	18,4	44,4

В связи с практическим интересом к полисахаридам особая роль отводится их реологическим свойствам, в т.ч. изучению вязкости. Для растворов полисахаридов характерна аномальная вязкость. Она высока даже в очень разбавленных растворах и уменьшается с увеличением давления на протекающую жидкость. Большая вязкость таких растворов определяется высокими силами сцепления гидрофильных молекул полисахаридов и воды. Кроме того, большое значение имеет анизодиаметрическая (т.е. имеющая неодинаковые длину и поперечные размеры) форма частиц. Вытянутая палочкообразная форма частиц в дисперсном растворе обуславливает наибольшую вязкость. В концентрированных растворах полисахаридов происходит взаимодействие макромолекул между собой с образованием ассоциатов и отдельных сетчатых структур, увеличивающих сопротивление течению. С увеличением концентрации объём свободного растворителя быстро уменьшается, потому что часть его оказывается в петлях структур. При увеличении внешнего давления или повышении скорости течения раствора пространственные структуры и ассоциаты разрушаются, растворитель освобождается, вязкость уменьшается. Кроме того, если в неподвижном растворе молекулы свёрнуты в клубок, то при движении жидкости через капилляр клубки распрямляются и превращаются в линейные молекулы, ориентируются по направлению движения. Это уменьшает сопротивление движущейся жидкости и ещё больше понижает вязкость. При повышенной концентрации полисахаридов число связей между молекулами растёт и образуются гели. Промышленная ценность многих полисахаридов заключается в способности изменять реологические свойства растворов путём образования геля и изменения характеристик текучести.

Определение кинематической вязкости 0,1% растворов экзополисахаридов водорастворимой фракции показало, что у *S. schevczenkovi* 43 и *L. lepideus* 1 она близка к вязкости воды (0,89 мм²/с) – 1,15 мм²/с, в то же время у *G. lucidum* 16 и *L. edodes* 182 вязкость полисахаридов этой фракции была в 1,8-2,2 раза выше. В щелочных растворах она составляла 1,51-3,15 мм²/с (табл. 84). В отличие от водных растворов эндополисахаридов, экзополи-

сахариды образовывали более вязкие растворы. Кинематическая вязкость 0,1% растворов водорастворимых фракций экзополисахаридов была в 1,3-2,8 раза, а щелочерастворимых в 1,6-2,5 раза выше вязкости воды (0,89 мм²/с).

Таблица 84. Вязкость 0,1% растворов экзополисахаридов различных видов грибов, мм²/с

Вид, штамм	Фракция полисахаридов		
	водорастворимая	щелочерастворимая (1% NaOH)	Щелочерастворимая (10% NaOH)
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	2,13	2,08	1,51
<i>Lentinus edodes</i> 182	2,54	2,27	3,15
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	1,15	1,79	2,42

Удельное вращение плоскости поляризации 0,1% растворов экзополисахаридов составляло: *G. lucidum* 16 – водорастворимая фракция – $[\alpha]_D^{20} -25^\circ$, щёлочерастворимая – $[\alpha]_D^{20} +15,2^\circ$; *L. edodes* 182 – $[\alpha]_D^{20} +130^\circ$ и $[\alpha]_D^{20} - 6,5^\circ$; *C. schevczenkovi* 43 – $[\alpha]_D^{20} -21^\circ$ и $[\alpha]_D^{20} +82,5^\circ$ соответственно.

Растворимые в воде и щелочи полисахариды исследованных штаммов фракционировали на ДЭАЕ целлюлозе с использованием в качестве элюента воды, 1 М и 2 М NaCl. Для установления молекулярных масс и гомогенности фракций полисахаридов грибов использовали гель-хроматографию на сефадексе G-200 (табл. 85).

Водорастворимая фракция экзополисахаридов *C. schevczenkovi* 43 с молекулярной массой менее 10 кДа оказалась гомогенной. Гомогенной была также фракция с молекулярной массой 200-300 кДа, растворявшаяся в 10% NaOH. Оба полисахарида присутствовали во фракции, растворимой в 1% NaOH, что свидетельствует о её гетерогенности.

Таблица 85. Молекулярная масса экзополисахаридов различных видов грибов, кДа

Фракция полисахаридов	Элюент	Вид, штамм		
		<i>Ganoderma lucidum</i> 16	<i>Lentinus edodes</i> 182	<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43
Водорастворимая	Вода	Mr=500 Mr<10	Mr<10	Mr<10
	1 М NaCl	Mr=500 Mr<10	Mr=200-300	-
Щелочерастворимая (1% NaOH)	Вода	Mr=500	Mr=500	-
	1 М NaCl	Mr=500	Mr=500	Mr<10, Mr=200 – 300
Щелочерастворимая (10% NaOH)	Вода	Mr=500	Mr=500	-
	1 М NaCl	-	-	Mr=200-300

Все фракции экзополисахаридов *L. edodes* 182, в отличие от *C. schevczenkovi* 43, оказались гомогенными. При этом водорастворимая фракция, элюируемая водой, характеризовалась низкой молекулярной массой (менее 10 кДа), а водорастворимая фракция, элюируемая 1 М NaCl, была высокомолекулярной (200-300 кДа). Все щёлочерастворимые фракции имели более высокую молекулярную массу (500 кДа).

В отличие от вышеуказанных видов грибов, водорастворимые фракции экзополисахаридов *G. lucidum* 16 оказались гетерогенными, представленными двумя полисахаридами с молекулярными массами менее 10 и 500 кДа. Щёлочерастворимые фракции были гомогенными, их молекулярные массы составляли 500 кДа (табл. 85).

Таким образом, в водорастворимых фракциях экзополисахаридов исследуемых штаммов преобладают низкомолекулярные полисахариды с Mr менее 10 кДа, а в щёлочерастворимых – высокомолекулярные с Mr 200-500 кДа.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод о нецелесообразности фракционирования данных полисахаридов

растворами щелочи с различной концентрацией, т.к. полисахариды, растворившиеся в 1% NaOH, присутствуют и в 10% NaOH.

Эндополисахариды также не растворялись в неорганических и органических кислотах, органических растворителях (спирт, ацетон, хлороформ и т.д.); при нагревании полностью растворялись в дистиллированной воде, а также в щелочах и диметилсульфоксиде.

Кинематическая вязкость 0,1% водных растворов эндополисахаридов различалась у исследованных штаммов незначительно, была близка к вязкости воды (0,89 мм²/с) и составляла у *G. lucidum* 16 0,96 мм²/с, у *L. edodes* 182 1,12 мм²/с, у *C. schevczenkovi* 43 1,03 мм²/с.

Выделенные и фракционированные по растворимости полисахариды уже частично освобождены от примесей. Дальнейшая, более тщательная их очистка от низкомолекулярных соединений и разделение на фракции проводится посредством диализа, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Для разделения нейтральных и кислых полисахаридов применяется метод ионообменной хроматографии. В качестве носителей используют ДЭАЭ- и эктеолацеллюлозу. Нейтральные полисахариды не задерживаются на названных анионитах, кислые, в зависимости от своей природы, более или менее прочно удерживаются и элюируются растворами солей, буферными растворами или щелочами.

Водные растворы эндополисахаридов фракционировали на ДЭАЭ целлюлозе с использованием в качестве элюента воды и 1 М NaCl, получены нейтральные и кислые фракции *G. lucidum* 16 и *L. edodes* 182, нейтральные фракции *L. lepideus* 1 и *L. tigrinus* 1.

Удельное вращение плоскости поляризации 0,1% растворов эндополисахаридов $[\alpha]_D^{20}$ составляло: *G. lucidum* 16 – водная фракция – $[\alpha]_D^{20} +10,9^\circ$, элюируемая 1 М NaCl – $[\alpha]_D^{20} +115^\circ$; *L. edodes* 182 – $[\alpha]_D^{20} -8,7^\circ$ и $[\alpha]_D^{20} -44^\circ$; *C. schevczenkovi* 43 – $[\alpha]_D^{20} +5,2^\circ$ и $[\alpha]_D^{20} +2,9^\circ$ соответственно, *G. lucidum* 16 – нейтральная фракция – $[\alpha]_D^{20} +19^\circ$, кислая фракция – $[\alpha]_D^{20} +110^\circ$; *L. edodes* 182 – $[\alpha]_D^{20} -8,2^\circ$ и $[\alpha]_D^{20} -40^\circ$ соответственно; *L. lepideus* 1 – $[\alpha]_D^{20} +30^\circ$ и *L. tigrinus* 1 – $[\alpha]_D^{20} +20^\circ$.

Гель-хроматография фракций полисахаридов, элюируемых водой, позволила установить их гомогенность для грибов *G. lucidum* 16 и *C. schevczenkovi* 43, их молекулярная масса составляла 500 кДа. В то же время элюируемая водой фракция полисахарида *L. edodes* 182 гетерогенна по своему составу. В ней преобладал полисахарид с

молекулярной массой 500 кДа, присутствовали также низкомолекулярные полисахариды (табл. 86).

Полисахариды фракций, элюируемых 1 М NaCl, оказались гетерогенными. В них присутствовали полисахариды с молекулярной массой 500 кДа и полисахариды с молекулярной массой меньше 10 кДа. Во фракциях, элюируемых 1 М NaCl, у *G. lucidum* 16 преобладал полисахарид с молекулярной массой 500 кДа, у *S. schevczenkovi* 43 – низкомолекулярный полисахарид (меньше 10 кДа), у *L. edodes* 182 наблюдалось приблизительно одинаковое соотношение низко- и высокомолекулярных полисахаридов (табл. 86).

Таблица 86. Молекулярная масса эндополисахаридов различных видов грибов, кДа

Элюент	Вид, штамм		
	<i>Ganoderma lucidum</i> 16	<i>Lentinus edodes</i> 182	<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43
Вода	Mr = 500	Mr = 500	Mr = 500
1 М NaCl	Mr = 500 Mr < 10кДа	Mr = 500 Mr < 10кДа	Mr = 500 Mr < 10кДа

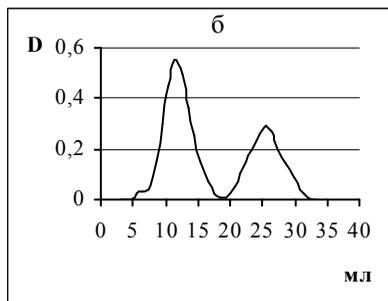
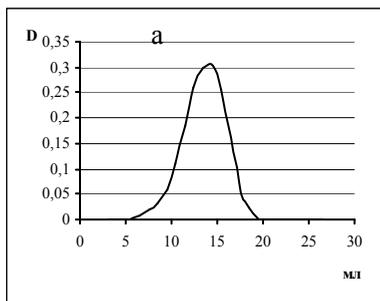


Рис. 56. Гель-хроматография нейтральной (а) и кислой (б) фракций эндополисахарида *Ganoderma lucidum* 16

Гель-хроматографию фракций полисахаридов проводили на Тоурpearl HW-65. Установлена гетерогенность кислых фракций полисахаридов грибов *L. edodes* 182, *G. lucidum* 16 и нейтральной фракции *L. edodes* 182.

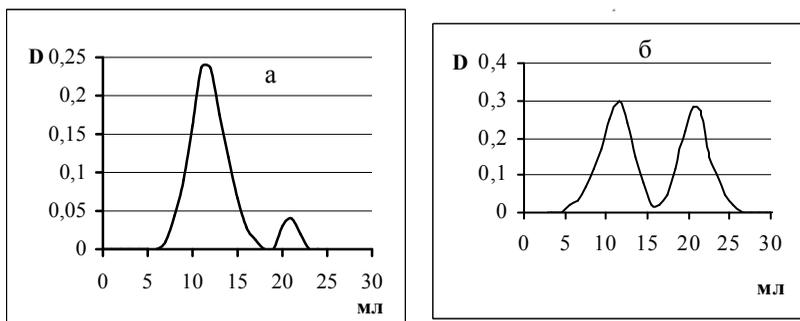


Рис. 57. Гель-хроматография нейтральной (а) и кислой (б) фракций эндополисахарида *Lentinus edodes* 182

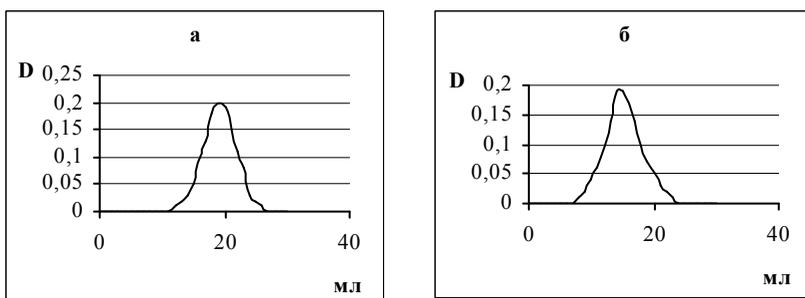


Рис. 58. Гель-хроматография нейтральных фракций эндополисахаридов *Lentinus lepideus* 1 (а) и *L. tigrinus* 1 (б)

В них преобладали высокомолекулярные полисахариды (400 кДа у *G. lucidum* 16 и 1000 кДа у *L. edodes* 182), присутствовали также низкомолекулярные полисахариды ($M_r < 10$ кДа). Нейтральные

фракции полисахаридов *G. lucidum* 16 ($M_r = 400$ кДа), *L. lepideus* 1 ($M_r = 200-300$ кДа) и *L. tigrinus* 1 ($M_r = 500$ кДа) также оказались гомогенны (рис. 56-58).

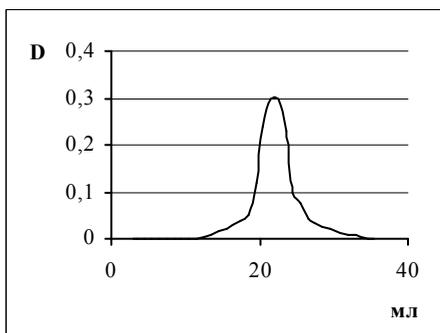


Рис. 59. Гель-хроматография водорастворимой фракции экзополисахарида *Lentinus lepideus* 1

Водорастворимые фракции экзополисахаридов *L. edodes* 182 оказались гомогенными, щелочерастворимые – гетерогенными. При этом водорастворимая фракция характеризовалась низкой молекулярной массой (менее 10 кДа), а в щёлочерастворимой фракции присутствовали полисахариды как с низкой, так и с высокой молекулярной массой (500-1000 кДа) (рис. 60).

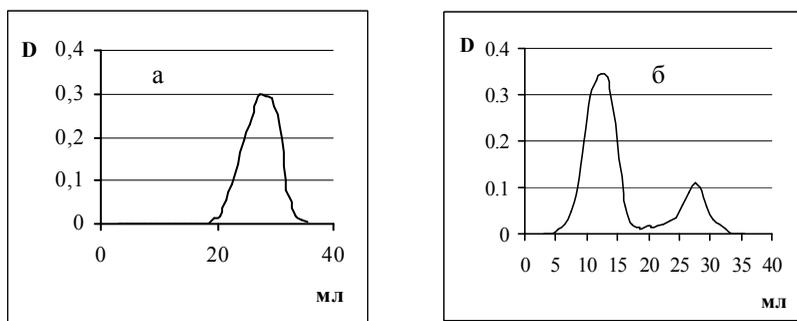


Рис. 60. Гель-хроматография водорастворимой (а) и щелочерастворимой (б) фракций экзополисахарида *Lentinus edodes* 182

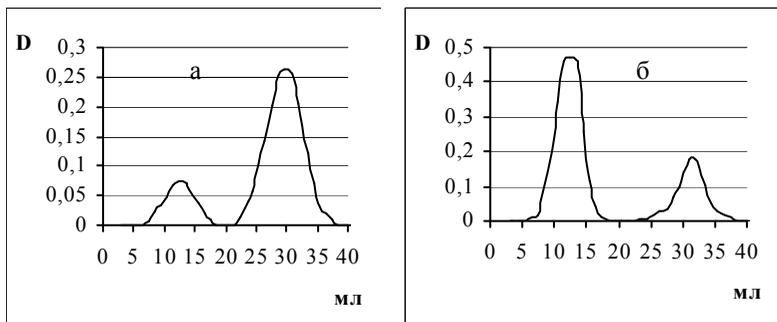


Рис. 61. Гель-хроматография водорастворимой (а) и щелочерастворимой (б) фракций экзополисахарида *Lentinus tigrinus* 1

В водорастворимых фракциях *L. tigrinus* 1 и *G. lucidum* 16 также преобладали низкомолекулярные полисахариды (менее 10 и 10-70 кДа соответственно), в щелочерастворимых – высокомолекулярные полисахариды 500-2000 кДа, в небольшом количестве присутствовали полисахариды с $M_r < 10$ кДа (рис. 61, 62).

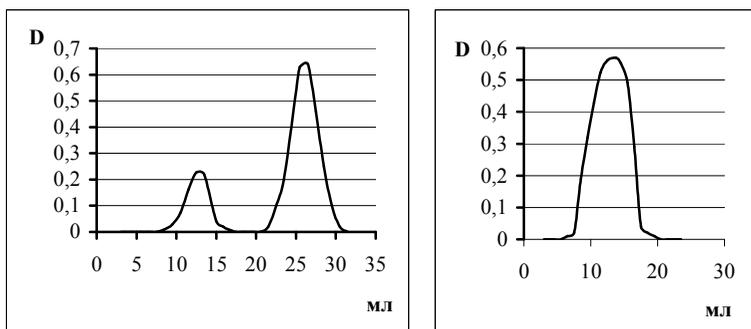


Рис. 62. Гель-хроматография водорастворимой (а) и щелочерастворимой (б) фракций экзополисахарида *Ganoderma lucidum* 16

В отличие от вышеуказанных грибов, водорастворимые фракции экзополисахаридов *G. lucidum* 16 оказались гетерогенными, представленными двумя полисахаридами с молекулярными массами менее 10 и 500 кДа. Щелоче-

растворимые фракции были гомогенными, их молекулярная масса составляла 500 кДа (рис. 62).

Таким образом, в водорастворимых фракциях экзополисахаридов у *L. edodes* 182, *L. tigrinus* 1 и *G. lucidum* 16 преобладают низкомолекулярные полисахариды с Mr менее 10 и 10-70 кДа, а в щёлочерастворимых – высокомолекулярные с Mr = 500-2000 кДа. Молекулярная масса водорастворимого экзополисахарида *L. lepideus* 1 составила 200-500 кДа.

Определение мономерного состава и структуры полисахаридов, наличия белковых компонентов

Как следует из данных табл. 87, полисахариды всех исследованных видов грибов являются гетерогликанами, основным мономером которых является глюкоза. Установлено, что содержание глюкозы в эндо- и экзополисахаридах каждого вида, кроме *L. lepideus*, варьировало незначительно. Экзополисахариды *L. lepideus* 1 содержали почти в 2 раза меньше глюкозы, чем эндополисахариды этого вида. Для них было также характерно, в отличие от полисахаридов других изученных видов, высокое содержание ксилозы, маннозы и небольшие количества арабинозы (табл. 87). Экзополисахариды *L. edodes* 182 отличались от эндополисахаридов значительно меньшим (в 2 раза) содержанием маннозы и галактозы. Наиболее высокое содержание глюкозы обнаружено в полисахаридах *L. tigrinus* 1 (табл. 87).

В составе внутри- и внеклеточных полисахаридов исследованных видов грибов обнаружен белок (0,3-5,9%), что позволило отнести их к пептидогликанам (табл. 88). Более высокое содержание белка отмечено в экзополисахаридах. В частности, в экзополисахаридах *L. lepideus* 1 содержалось в 15 раз больше белка, чем в эндополисахаридах.

Как следует из табл. 89, углеводный состав водорастворимой фракции экзополисахаридов *C. schevczenkovi* 43 и *G. lucidum* 16 представлен галактозой и глюкозой с преобладанием последней, тогда как в экзополисахаридах *L. edodes* 182 входит в основном глюкоза и небольшое количество маннозы. Щелочерастворимые фракции экзополисахаридов изучаемых видов грибов отличаются от водорастворимых большим содержанием глюкозы, экзополисахариды *C. schevczenkovi* 43 на 100% состоят из глюкозы.

Таблица 87. Углеводный состав фракций полисахаридов различных видов грибов, %

Вид, штамм	Углеводы, %				
	Глюкоза	Манноза	Галактоза	Арабиноза	Ксилоза
<i>Ganoderma lucidum</i> 16 (эндополисахарид)	84,2	2,8	13	–	–
<i>G. lucidum</i> 16 (экзополисахарид)	82,8	2,2	15	–	–
<i>Lentinus edodes</i> 182 (эндополисахарид)	75,5	14	10,5	–	–
<i>L. edodes</i> 182 (экзополисахарид)	88	7,4	4,6	–	–
<i>L. lepideus</i> 1 (эндополисахарид)	80,9	6,9	9,9	2,3	–
<i>L. lepideus</i> 1 (экзополисахарид)	43,6	22,2	11	1,4	21,8
<i>L. tigrinus</i> 1 (эндополисахарид)	90,2	1,5	8,3	–	–
<i>L. tigrinus</i> 1 (экзополисахарид)	96,4	2,2	сл.	сл.	1,4

В щелочерастворимой фракции полисахаридов *L. edodes* 182 содержится меньшее количество маннозы, чем в водорастворимой. Соотношение глюкозы и галактозы (маннозы) в экзополисахаридах изученных видов незначительно отличаются между собой (табл. 89).

Эндополисахариды *C. schevczenkovi* 43, элюируемые водой, как и щелочерастворимые экзополисахариды, являются гомоглюканами и состоят на 100% из глюкозы. Элюируемая солью фракция эндополисахаридов этого гриба представлена галактозой и глюкозой. В составе элюируемой водой фракции эндополисахаридов *G. lucidum* 16 обнаружены манноза, галактоза и глюкоза, а элюируемой солью – манноза и глюкоза.

Характерной особенностью эндополисахаридов *L. edodes* 182 является наличие значительного количества галактозы и преобладание глюкозы (табл. 90).

Таблица 88. Содержание белка в полисахаридах различных видов грибов

Вид, штамм	Содержание белка в полисахаридах, %	
	Эндополисахариды	Экзопполисахариды
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	1,5	3,9
<i>Lentinus edodes</i> 182	5,1	5,9
<i>L. lepideus</i> 1	0,3	4,5
<i>L. tigrinus</i> 1	0,7	1,3

Таблица 89. Моносахаридный состав фракций экзополисахаридов различных видов, %

Вид, штамм	Водорастворимые				Щелочерастворимые			
	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Соотношение	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Соотношение
<i>Crinipellis schevczenkovi</i> 43	-	8,26	91,74	1:11*	-	сл.	100	-
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	сл.	4,99	95,0	1:19*	1,56	сл.	98,44	1:63**
<i>Lentinus edodes</i> 182	6,90	сл.	93,1	1:13**	2,77	сл.	97,2	1:35**

* – Соотношение содержания глюкозы и галактозы; ** – глюкозы и маннозы.

Таким образом, большинство полисахаридов исследованных грибов являются гетерогликанами. Исключение составляют щелочерастворимые экзополисахариды и элюируемые водой эндополисахариды *C. schevczenkovi* 43, оказавшиеся гомогликанами.

В составе внутри- и внеклеточных полисахаридов грибов обнаружено значительное количество белка (1,2-8,2%), что позволило отнести их к пептидогликанам.

Анализ аминокислотного состава гидролизатов полисахаридов грибов показал наличие в них 17 аминокислот. Сумма их в эндополисахаридах составила 15-51 мг/г, в экзополисахаридах 39-59 мг/г (водная фракция) и 12-82 мг/г (щелочная фракция).

Таблица 90. **Моносахаридный состав фракций эндополисахаридов различных видов грибов, %**

Вид, штамм	Водорастворимые, элюируемые водой				Водорастворимые, элюируемые 1 М NaCl			
	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Соотношение	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Соотношение
<i>Crinipellis schewczenkovi</i> 43	-	сл.	100	-	-	3,04	96,96	1:31 *
<i>Ganoderma lucidum</i> 16	3,21	5,36	91,4	1:2:28	3,45	сл.	96,55	1:27 **
<i>Lentinus edodes</i> 182	2,66	36,14	61,2	1:14:23	9,36	12,38	78,26	1:2:8

Обозначения те же, что и в табл. 89.

Многие иммуностимулирующие и противоопухолевые полисахариды, получаемые из плодовых тел и мицелия грибов (ганодеран из *G. lucidum*, KS-2 из *L. edodes*, PSP и PSK из *C. versicolor* и др.), также содержат белок (до 10-50% по сухому весу). По данным некоторых авторов, полисахаридпептидные комплексы обладают более сильным биологическим действием, чем соответствующие гликаны (Wasser, Weis, 1999).

Для определения строения фракций полисахаридов грибов и типов гликозидных связей анализировали их ИК-спектры. Их расшифровка представляет весьма трудную задачу из-за

наличия большого числа СН- и ОН-групп, малой упорядоченности упаковки цепи, возможной конформационной неоднородности отдельных моносахаридных звеньев и различных полигликозидных цепей, а также наличия водородных связей различных типов (Степаненко, 1978).

ИК-спектры фракций экзо- и эндополисахаридов штаммов *G. lucidum* 16, *C. schevchenkovi* 43 и *L. edodes* 182 показали большое сходство между собой и характеризовались интенсивными полосами поглощения в области 1100-1000 см⁻¹, характерными для класса углеводов в целом (рис. 63-65).

Наиболее интенсивные полосы поглощения находились в области 3400 см⁻¹. Их следует рассматривать как проявление валентных колебаний –ОН- групп. Во всех образцах ОН-группы включены в меж- и внутримолекулярные водородные связи, о чём свидетельствует смещение максимума в область меньших волновых чисел относительно максимума поглощения свободного гидроксила (3615 см⁻¹). Полоса 2940 см⁻¹ с плечом в коротковолновой области свидетельствует о проявлении колебаний СН₂-групп (Елинов, 1989).

В спектрах поглощения полисахаридов явно наблюдается асимметрия пика в области 3050-3200 см⁻¹ (NH-водородно-связанный) и наличие пиков в областях 1650 (амид I) и 1550 (амид II), что является подтверждением того, что полисахариды исследуемых грибов содержат белковую часть. Качественная реакция на белок по Бредфорду также показала наличие белка в комплексе с полисахаридом.

Отличия в колебаниях амидов указывают на неодинаковую степень аминирования полисахаридов разных фракций (Brugurotto et al., 2001). В ИК-спектрах экзополисахаридов трех исследуемых грибов полосы поглощения амидов более ярко выражены в водорастворимой фракции. Полученные результаты сопоставимы с данными (Gutierrez et al., 1996), где методом ИК-спектроскопии обнаружены белковые фрагменты в водорастворимой фракции экзополисахаридов грибов рода *Pleurotus*. Для эндополисахаридов также можно выделить закономерность: амидные пики более ярко выражены в заряженных солевых фракциях полисахаридов.

Одной из наиболее информативных областей является диапазон 1200-800 см⁻¹ – область «отпечатков пальцев

углеводов». Во всех образцах присутствовали полосы, свойственные деформационным колебаниям $-C-C-$, $-C-O-$, $C-H$ и OH -групп, а также полоса в области 1150 см^{-1} , которая обусловлена колебанием связи $-C-O-$ при втором углеродном атоме кольца (C_2-O-). В аномерном регионе ($800-900\text{ см}^{-1}$) присутствуют полосы, характеризующие тип и направление связей (Wang et al., 2004). Именно в этой области наиболее чётко видны структурные различия полисахаридов.

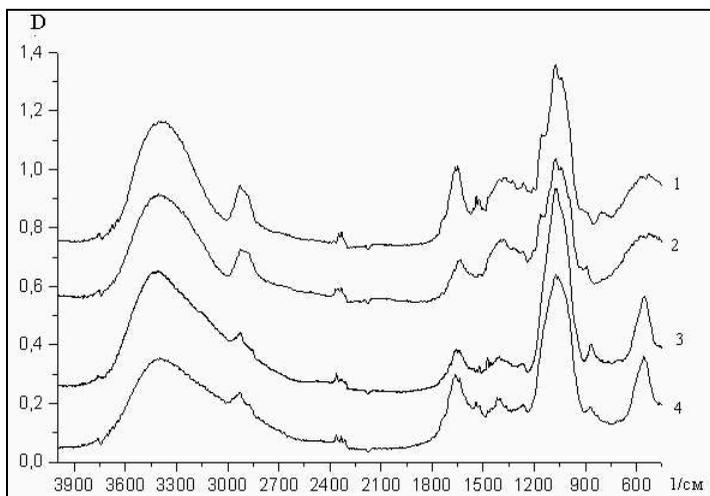


Рис. 65. ИК-спектры фракций полисахаридов *Ganoderma lucidum* 16: 1 – водная фракция экзополисахаридов; 2 – щелочная фракция экзополисахаридов; 3 – элюируемая водой фракция эндополисахаридов; 4 – элюируемая 1 М NaCl фракция эндополисахаридов

В спектрах водо- и щелочерастворимой фракций экзополисахаридов *G. lucidum* 16 полосы в области 890 и 1370 см^{-1} указывают на наличие β -гликозидных связей. Имеются также полосы поглощения при 920 , 840 и 760 см^{-1} , характерные для α -аномера (Gutierrez et al., 1996). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей (Berovic et al., 2003), которые также зафиксировали наличие в водорастворимой фракции экзополисахаридов *G. lucidum* 16 как β -, так и α -гликозидные связи. Очевидно, что степень раст-

воримости экзополисахаридов гриба не зависит от аномерного типа гликозидной связи между мономерами, а определяется другими факторами.

Как и в случае экзополисахаридов, в обеих фракциях эндополисахаридов присутствуют пики, соответствующие β - и α -типам гликозидной связи. Для всех фракций экзо- и эндополисахаридов *G. lucidum* 16 β -связь выражена ярче. Полученные данные не противоречат литературным данным (Berovic et al., 2003).

Полоса $890\text{-}900\text{ см}^{-1}$ в спектре водорастворимой и щелочерастворимой фракций экзополисахаридов *L. edodes* 182 указывает на присутствие β -типа связи. В двух фракциях внутриклеточного полисахарида помимо β -связи присутствует также α аномер. Причем в водной фракции полосы поглощения, соответствующие α -связи, выражены интенсивнее.

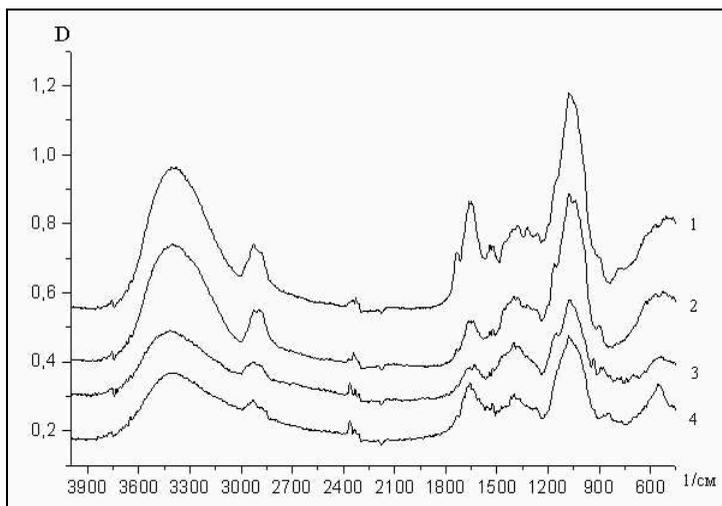


Рис. 66. ИК-спектры фракций полисахаридов *Lentinus edodes* 182: 1 – водная фракция экзополисахаридов; 2 – щелочная фракция экзополисахаридов; 3 – элюируемая водой фракция эндополисахаридов; 4 – элюируемая 1 М NaCl фракция эндополисахаридов

Спектры водной и щелочной фракций экзополисахаридов *S. chevchenkovi* 43 в области $800\text{-}900\text{ см}^{-1}$ практически не разли-

чаются. В обеих фракциях можно выделить пик 890-900 см⁻¹, соответствующий β-типу связи. Во фракциях эндополисахаридов гриба есть полосы поглощения, соответствующие как β-, так и α-типам гликозидных связей. Причем, как и в случае *L. edodes*, α-связь выражена в водной фракции интенсивнее.

Таким образом, ИК-спектры фракций экзо- и эндополисахаридов исследуемых грибов обнаружили большое сходство между собой. Полисахариды всех фракций *G. lucidum* 16 и эндополисахариды *C. shevchenkovi* 43 и *L. edodes* 182 – глюканы с α- и β-типами гликозидных связей. В экзополисахаридах *C. shevchenkovi* 43 и *L. edodes* 182 присутствует только β-гликозидная связь (рис. 65, 66).

Для определения положения гидроксиллов, соединяющих моносахаридные звенья в молекуле полисахарида, широко применяется метод периодатного окисления в сочетании с боргидридным восстановлением (распад по Смит). Периодатное окисление полисахаридов в определенных условиях протекает строго количественно.

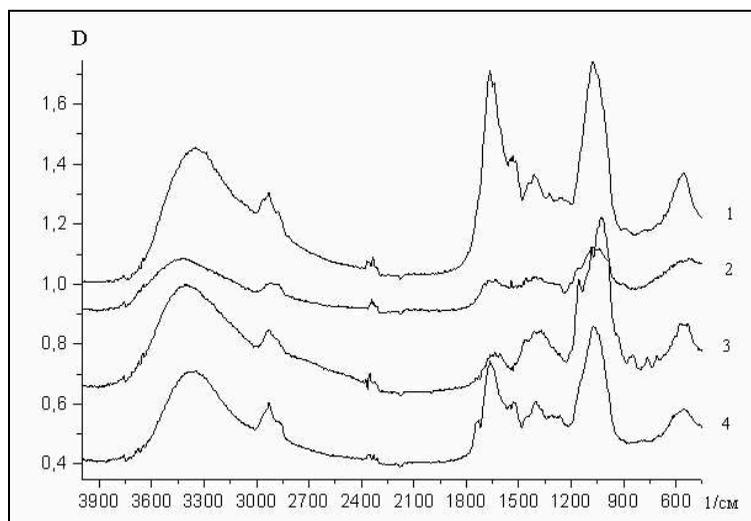


Рис. 67. ИК-спектры фракций полисахаридов *Crinipellis shevchenkovi* 43:

- 1 – водная фракция экзополисахаридов; 2 – щелочная фракция экзополисахаридов; 3 – элюируемая водой фракция эндополисахаридов; 4 – элюируемая 1 М NaCl фракция эндополисахаридов

Таблица 91. Периодатное окисление фракций полисахаридов различных видов грибов

Фракции полисахаридов	Расход периодата, моль/моль ангидрогексоз	Образование формиата, моль/моль ангидрогексоз	Продукты гидролиза	Тип связи в боковых цепях
<i>Ganoderma lucidum</i> 16				
Экзополисахариды, водная	2,2	1,9	Глицерин, эритрит	1-4 1-6
Экзополисахариды, щелочная	0,5	сл.	Глицерин, эритрит	1-4 1-6*
Эндополисахариды, водная	0,9	сл.	Глицерин, эритрит	1-4 1-6*
Эндополисахариды, солевая	0,8	сл.	Глицерин, эритрит	1-4 1-6*
<i>Lentinus edodes</i> 182				
Экзополисахариды, водная	1,4	0,8	Эритрит	1-4
Экзополисахариды, щелочная	0,6	0,4	Глицерин, эритрит	1-4 1-6
Эндополисахариды, водная	0,2	сл.	Глицерин, эритрит	1-4 1-6*
<i>Crinipellis schevzenkovi</i> 43				
Экзополисахариды, водная	0,1	0,08	Глицерин, эритрит	1-4 1-6*
Экзополисахариды, щелочная	2	0,7	Эритрит	1-4
Эндополисахариды, водная	0,1	сл.	Эритрит	1-4
Эндополисахариды, солевая	0,2	0,18	Эритрит	1-4

* – Незначительное количество; сл. – следовые количества.

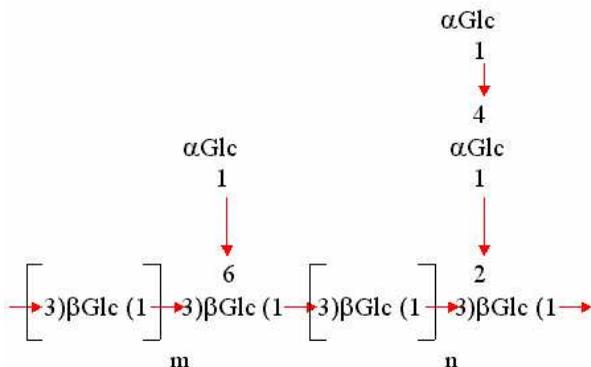


Рис. 68. Схематическое строение молекул полисахаридов изученных видов грибов

При этом разрываются связи углеродных атомов, несущих α -диольные группы, образуется диальдегид и расходуется 1 моль периодата. При наличии вицинальной триольной группировки средний углеродный атом вычлняется в виде муравьиной кислоты, образуется диальдегид и расходуется 2 моля периодата. Результаты периодатного окисления оцениваются по убыли периодата и определению количества образовавшейся муравьиной кислоты. Использование периодатного окисления наряду с боргидридным восстановлением позволяет обнаружить соответствующие полиолы и тем самым установить структуру исходного полисахарида (Степаненко, 1978).

Как следует из данных табл. 91, при периодатном окислении с последующим боргидридным восстановлением исследованных полисахаридов происходит потребление периодата натрия и образование муравьиной кислоты, а продуктами гидролиза восстановленных полисахаридов являются глицерин, эритрит и непрогидролизованный остаток полисахаридов.

На основании результатов ИК-спектроскопии и деградации по Смитсу можно заключить, что исследованные полисахариды являются разветвленными гликанами, содержащими α и β гликозидные связи. Основная цепь полисахаридов представлена глюканом с (1 \rightarrow 3)-связями, а в боковых цепях имеются (1 \rightarrow 4) и (1 \rightarrow 6)-связи (рис. 68).

Сорбционный потенциал грибов и их структурных компонентов

Феноменальная способность мицелиальных грибов, произрастающих на загрязненных территориях, аккумулировать радионуклиды и тяжелые металлы в мицелии и плодовых телах хорошо известна. Грибы, выросшие вблизи источников промышленных выбросов, как правило, имеют более высокое содержание тяжелых металлов в биомассе, чем те же виды из «чистых» мест обитания. При произрастании грибов на загрязненных почвах содержание тяжелых металлов в плодовых телах может в 100-500 раз превышать их концентрацию в субстрате.

Устойчивость грибов к токсическому действию тяжелых металлов включает разные механизмы: связывание экзометаболитами, сорбцию клеточными структурами, накопление в виде нерастворимых соединений и др. Изучение ультратонкого строения клеточной стенки показывает, что она имеет оптимальную структуру для биосорбции. Можно с уверенностью говорить, что эта структура выработалась для защиты живого протопласта клетки в результате длительной эволюции грибов в условиях обитания в средах с высоким содержанием тяжелых металлов.

Исследования, проведенные в Республике Беларусь в течение последних лет, свидетельствуют о неуклонном росте заболеваний, связанных непосредственно или косвенно с поступлением в организм человека токсичных соединений (пестицидов, радионуклидов, тяжелых металлов и др.) вследствие ухудшения экологической обстановки (Kakareka, Homich, 1998). Одним из тяжелых последствий катастрофы на ЧАЭС является загрязнение большой территории республики свинцом. У значительной части населения Беларуси, особенно у детей, выявлено повышенное содержание данного металла в крови (Кручинский и др., 1981). Наряду с этим в республике ежегодно в окружающую среду попадает до 50 тысяч тонн тяжелых металлов. Это выбросы промышленных предприятий, транспорта, отходы, образующиеся при сжигании твердого и жидкого топлива.

Установлено, что цитотоксичность тяжелых металлов обусловлена тремя взаимосвязанными механизмами: усиле-

нием перекисного окисления липидов как за счет снижения антиокислительной защиты клетки (Nagyova et al., 1994), так и за счет непосредственной прооксидантной активности некоторых металлов (Schaich, 1992; Sarkar et al., 1994), угнетением митохондриального дыхания вследствие изменения мембранного потенциала митохондрий и нарушения активности ферментов дыхательной цепи и цикла Кребса (Kessler, Brand, 1994); нарушением кальциевого гомеостаза клетки за счет изменения внутриклеточного потока кальция (Ambrosi et al., 1990), замены кальция на специфических рецепторах с последующей активацией кальцийзависимых ферментов (Albano et al., 1994. Mateo et al., 1994). Тяжелые металлы связываются с сульфогидрильными группами специфических или неспецифических белков, выполняющих транспортную функцию, что ведет к изменению клеточной проницаемости (Coban et al., 1996).

Одним из наиболее опасных токсикантов является свинец. Он характеризуется большим коэффициентом накопления в организме, низкой скоростью и неполнотой выделения с продуктами жизнедеятельности. Свинцовое загрязнение является одним из многочисленных экологических бедствий, особенно в Беларуси, на территории которой рассеялось огромное количество данного металла, так как им пытались снизить радиационный поток после взрыва на ЧАЭС (Gromov, Paramonov, 2000). Свинец занимает первое место среди промышленных отравлений. Отравление свинцом чрезвычайно опасно для детей, так как он отрицательно действует на развитие мозга и нервной системы (Halliwell, Carroll, 1994). Даже при низких дозах поступления свинец вызывает снижение интеллектуального развития, ведет к агрессивности, гиперактивности и другим проблемам в поведении ребенка. Не менее опасен для здоровья кадмий, загрязняющий многие экосистемы и продукты питания (Lonwerys et al., 1994). Кадмий, ртуть, свинец, хром, мышьяк, железо и др. способны депонироваться в паренхиматозных органах. Период полувыведения для кадмия составляет более 10 лет, для свинца – около 30 лет (Fowler, 1992).

Поэтому необходимы такие профилактические средства, которые способствовали бы преимущественному выведению радионуклидов и тяжелых металлов и могли бы применяться в течение продолжительного времени в виде добавок к обычным

продуктам питания, не нарушая при этом обмена веществ и не оказывая токсического воздействия на организм человека. Наиболее приемлемыми являются природные сорбенты, к которым относят производные целлюлозы, пектиновые вещества, хитин и др. Они также способствуют нормализации работы желудочно-кишечного тракта.

Из-за сложной экологической обстановки во многих регионах республики продукты растениеводства, богатые пищевыми волокнами, сами зачастую содержат поллютанты, опасные для здоровья (Chodak, 2000). Весьма перспективным сырьем экологически чистых субстанций с высокими сорбционными характеристиками являются высшие дереворазрушающие базидиальные грибы, выращенные в искусственных условиях.

Основной структурой грибов, обеспечивающей сорбцию, является клеточная стенка. Структурную ее основу составляет биополимер хитин, состоящий из неразветвленных цепей β – (1 \rightarrow 4)-связанных остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-глюкозы и являющийся единственным полисахаридом, в молекуле которого имеется азот, входящий в ацетамидную группу. Благодаря этому хитин и ряд его производных обладают мощными сорбционными способностями, которые зависят от степени упорядоченности молекул полимера. Основным механизмом сорбции у хитина является хелатирование. Эта структура имеет высокое сродство к тяжелым металлам и индифферентна к основным биогенным металлам – калию, натрию, кальцию (Горовой, Косяков, 1996).

Сорбция является сложным процессом, в котором существенное значение имеет состав биополимеров клеточной стенки грибов. Микрофибриллы хитина связаны с другими компонентами: α - и β -глюканами, пигментами и белками. Структурную основу клеточной стенки составляет комплекс хитина с β -1,3-глюканом. От соотношения этих биополимеров зависит интенсивность сорбции определенных ионов тяжелых металлов (Терешина и др., 1999).

В сорбционных процессах участвуют как структурные биополимеры клеточной стенки, так и вещества, составляющие ее матрикс. α - и β -формы хитина могут образовывать стабильные гликопротеиновые комплексы, в которых хитин связан с белками через аспарагиновые и гистидиновые остатки. Вероятно, эта

связь осуществляется через карбоксиаминокислоты и аминокислоты N-ацетил-D-глюкозамина (Burdukova, Gorovoj, 2001). Под действием некоторых факторов наблюдается увеличение содержания белка в клеточной стенке грибов (Феофилова и др., 1994). При этом связь хитина с другими компонентами клеточной стенки становится более прочной (Терешина и др., 1999).

Сорбционные свойства грибной биомассы во многом определяются надмолекулярной структурой, качественным и количественным составом биополимеров клеточной стенки, которые в значительной степени зависят от физиологического состояния гриба. Низкое содержание полиглюкозаминов обычно обнаруживается на ранних стадиях роста, в процессе культивирования их количество повышается, достигая устойчивого максимального значения в конце экспоненциальной фазы роста (Di Lena et al., 1994).

Несмотря на то, что исследователями выполнен значительный объем работ, посвященных изучению различных аспектов взаимодействия грибов с ионами тяжелых металлов, многие вопросы до сих пор остаются открытыми. Природа взаимодействия между ионом металла и функциональными группами структурных биополимеров клетки может носить весьма сложный характер.

Основным механизмом связывания ионов кадмия является хелатирование, в то время как для ионов никеля характерен в основном ионный обмен. Связывание ионов свинца биомассой может включать комбинацию ионного обмена, хелатирования, окислительно-восстановительных реакций, осаждение в матрице клеточной стенки. В процессе ионнообменных реакций ионы тяжелых металлов замещают катионы водорода, кальция, магния, а в некоторых случаях также калия и натрия (Raize et al., 2004).

Процесс связывания ионов тяжелых металлов биосорбентами различной природы и его эффективность зависят от ряда внешних факторов, к которым относят концентрацию ионов металла в растворе, длительность контакта в системе сорбент-сорбат, кислотность раствора, определяющая состояние как металла, так и сорбента, присутствие химических соединений различной природы, температуру и др. (Вербич и др., 1994).

Важной характеристикой сорбента является его сорбционная активность. Время достижения состояния динамического равновесия между биосорбентами и ионами тяжелых металлов может колебаться в довольно широком диапазоне (Коронелли и др., 1999; Prakasham et al., 1999).

Количество катионов тяжелых металлов, связанное грибной биомассой после достижения состояния динамического равновесия, во многом зависит от их концентрации. Так как в растворах с высокой степенью разбавления отмечается прямая корреляция между содержанием сорбата в растворе и сорбенте, коэффициент распределения K_d в таких системах сохраняет постоянное значение.

При высоких концентрациях ионов металлов в растворах их сорбция микробной биомассой может происходить не только в результате связывания с функциональными группами, но и за счет эффекта кооперативного воздействия, когда наряду со связыванием металла непосредственно с функциональными группами возможно образование связей между сорбированными ионами и ионами, находящимися в растворе (Gadd, Rome, 1988; Gadd, 1993).

Эффективность сорбции тяжелых металлов биосорбентами, как правило, возрастает по мере приближения кислотности растворов к нейтральной области (Luef et al., 1991). Максимальные значения сорбционной емкости проявляются в такой области pH, когда функциональные группы переходят в координационную форму, а выпадение гидроксидов и основных солей металлов еще невозможно. У большинства функциональных групп степень диссоциации достигает максимума в нейтральной среде (Иванов и др., 2003).

В естественных условиях сорбция того или иного вещества протекает в присутствии соединений различной природы, которые способны конкурировать за центры связывания или вступать в активное взаимодействие с сорбатом (Aloysius et al., 1999). Конкуренция между ионами различных тяжелых металлов, для которых свойственно взаимодействие с одними и теми же функциональными группами (Вербич и др., 1994), может значительно снижать как количественные, так и качественные характеристики сорбционного процесса.

Данные о действии температуры на процессы связывания ионов металлов грибами свидетельствуют о том, что этот

фактор оказывает большое влияние лишь на энергозависимые метаболические процессы биосорбции в живом мицелии. Связывание ионов тяжелых металлов нежизнеспособной биомассой и ее компонентами является быстрым пассивным процессом, не требующим энергетических затрат. Химические процессы взаимодействия ионов металлов со структурами клеточной стенки мало зависят от температуры (Yalcinkaya et al., 2002).

Одним из важнейших факторов, определяющих состояние самого сорбента, является влажность. Доступность и активность функциональных групп на поверхности сорбента для связывания ионов тяжелых металлов, удельная поверхность, размеры пор и другие структурные характеристики, обеспечивающие сорбционные свойства биосорбентов, в значительной степени зависят от уровня гидратированности биополимеров. При изготовлении грибных биосорбентов условия удаления избыточной влажности очень широко варьируют. В одних случаях просто удаляют излишки воды с использованием вакуумного насоса (Yalcinkaya et al., 2002), в других – сушат до постоянной влажности под навесами, защищающими от солнечных лучей, в третьих – используют сырую биомассу, не добиваясь достижения определенной влажности (Vianna et al., 2000).

Препараты грибных энтеросорбентов успешно завоевывают рынок. Это «Микотон», который изготавливают из плодовых тел *Fomes fomentarius*, и «Мипровит», созданный на основе гриба *Trametes hirsutus*. У лечебно-оздоровительных препаратов на основе базидиальных грибов не выявлены нежелательные побочные эффекты и токсическое действие (Горшина и др., 1997; Горовой, 1999, 2006; Горшина, Скворцова, 2005). Если энтеросорбенты (полифепан, билигнин, активированный уголь и др.) рекомендуется использовать только периодически, то грибные сорбенты можно добавлять в пищу систематически. Помимо сорбции экзотоксикантов они оказывают и общее положительное действие на работу органов (Дудкин и др., 1997; Дудкин, Щелкунов, 1998).

Широкое внедрение в практику функциональных продуктов с сорбционными свойствами на основе базидиальных грибов может стать эффективным способом коррекции структуры питания населения с целью профилактики и вспомогательной терапии многих экологозависимых заболеваний.

Оценка сорбционных свойств видов ксилотрофных базидиомицетов

В качестве сорбата при оценке сорбционных свойств грибов за основу взята медь, поскольку это необходимый для нормальной жизнедеятельности организмов микроэлемент, в повышенных же концентрациях по своей токсичности она значительно превосходит большинство тяжелых металлов, уступая лишь ртути и кадмию.

Изучение способности глубинного мицелия 34 видов базидиальных грибов извлекать медь из растворов с относительно высокой концентрацией (0,1 н.) показало наличие сорбционных свойств у всех исследованных культур. Максимум сорбционной емкости по иону Cu^{2+} колебался от 0,36 мг-экв/г (11,5 мг/г) у *Phanerochaete chrisosporium* до 1,89 мг-экв/г (63,4 мг/г) у *Pleurotus ostreatus*. Среди исследованных культур 45,33% связывало более 35 мг меди на 1 г сухой биомассы.

Пятнадцать культур, показавших относительно высокую сорбционную активность по иону меди (более 30 мг/г) и хорошо растущих в глубинной культуре (более 7 г/л), были проверены на способность связывать ионы свинца и кадмия, которые по своей токсичности входят в число поллютантов, наиболее опасных для здоровья человека. Поскольку содержание свинца и кадмия в пищевых продуктах (ПДК) не должно превышать 0,5 и 0,05 мг/кг, для исследования использовали разбавленные 0,25 мМ растворы, содержащие 51 мг/л свинца и 28 мг/л кадмия, моделирующие поступление этих элементов в организм человека с водой и загрязненными продуктами питания (Goncharova, Babitskaya, 2000).

Наиболее высокую активность проявил *Trametes hirsuta* 27, сорбирующий кадмий в 1,5-10 раз больше, чем мицелий других исследованных культур. *T. hirsuta* 27 связывал в 2,2 раза больше свинца и в 3,2 раза больше кадмия, чем коммерческий энтеросорбент «Полифепан». Высокую сорбционную активность к этим токсикантам проявил также *L. lepideus* 1 (табл. 92).

Сорбционные свойства грибной биомассы зависят не только от видовой, но и от штаммовой принадлежности. Сорбционная способность 5 исследованных штаммов *L. edodes* по отношению к ионам кобальта, цинка, никеля, свинца, марганца, меди, кадмия и железа варьировала в довольно широких пределах (табл. 93).

Таблица 92. Сорбция тяжелых металлов из разбавленных растворов мицелием разных видов базидиомицетов

Ион	Сорбционная емкость					
	<i>Trametes hirsuta</i> 27		<i>Lentinus lepideus</i> 1		Полифепан	
	мг/г	мг-экв/г	мг/г	мг-экв/г	мг/г	мг-экв/г
Co ²⁺	3,4	0,12	1,4	0,05	1,3	0,04
Zn ²⁺	3,2	0,10	2,1	0,06	1,4	0,04
Ni ²⁺	3,8	0,13	0,8	0,03	1,8	0,06
Pb ²⁺	16,4	0,16	13,9	0,14	7,3	0,07
Mn ²⁺	3,0	0,11	2,1	0,08	0,9	0,03
Cu ²⁺	4,2	0,13	1,3	0,06	2,3	0,06
Cd ²⁺	11,3	0,20	7,9	0,15	3,5	0,05
Fe ³⁺	6,6	0,35	3,0	0,15	1,2	0,07

Таблица 93. Сорбция ионов тяжелых металлов из разбавленных растворов различными видами и штаммами грибов

Ион	Сорбционная емкость грибов, мг/г				
	<i>Lentinus edodes</i> , штамм				
	104	109	181	185	192
Co ²⁺	2,0	1,5	1,1	1,4	1,1
Zn ²⁺	2,5	1,7	1,2	1,3	1,3
Ni ²⁺	2,1	1,5	1,0	1,2	1,0
Pb ²⁺	6,8	5,1	5,1	16,6	7,4
Mn ²⁺	1,9	1,2	1,2	1,4	1,1
Cu ²⁺	3,0	1,4	1,1	1,3	1,0
Cd ²⁺	7,3	4,2	4,3	5,6	4,6
Fe ³⁺	6,5	3,7	4,2	4,7	3,6
<i>Ganoderma lucidum</i> , штамм					
Ион	1	IBK 1787	IBK 921	IBK 1607	IBK 1608
Cu ²⁺	2,0	1,7	2,5	2,3	2,6
Pb ²⁺	8,1	11,5	14,8	14,4	16,4
Cd ²⁺	5,4	5,5	7,8	6,9	8,0

Штамм 185 по активности связывания свинца не уступал грибу *T. hirsuta* 27, превосходя по этому показателю в 2,2-3,3 раза другие исследованные штаммы гриба. Штамм 104 показал

наиболее высокую сорбционную активность по отношению к ионам кадмия.

Высокой сорбционной емкостью по отношению к свинцу и кадмию характеризуется глубинный мицелий *G. lucidum* (табл. 42). *G. lucidum* 1608 по уровню сорбции свинца практически не уступает *L. edodes* 185, а по количеству связанного кадмия значительно превосходит все исследованные штаммы данного вида.

Штаммы *P. ostreatus* по скорости роста мицелия в глубинной и поверхностной культурах и выходу биомассы на различных субстратах превосходят большинство культивируемых ксилотрофных базидиомицетов. Сорбционные свойства этих штаммов характеризуются высокой вариабельностью. Из исследованных штаммов лучше других извлекал свинец и кадмий из разбавленных растворов *P. ostreatus* 43 (табл. 94).

Высокими сорбционными свойствами характеризуется пигментированная грибная биомасса. Меланинсинтезирующие грибы *Phellinus robustus* и *Inonotus obliquus* активно связывали тяжелые металлы, однако сорбционная емкость по отношению к ионам свинца и кадмия уступала по аналогичным показателям *T. hirsuta* 27.

Таблица 94. Сорбция ионов тяжелых металлов из разбавленных растворов глубинным мицелием штаммов *Pleurotus ostreatus*

Ион	Сорбционная емкость, мг/г		
	<i>P. ostreatus</i> 35	<i>P. ostreatus</i> 43	<i>P. ostreatus</i> 45
Co ²⁺	0,7	1,4	1,3
Zn ²⁺	0,5	1,9	1,5
Ni ²⁺	0,4	1,5	1,2
Pb ²⁺	7,7	10,8	10,7
Mn ²⁺	0,5	1,3	0,8
Cu ²⁺	0,8	1,7	1,2
Cd ²⁺	2,9	3,9	3,2
Fe ³⁺	2,4	3,3	3,5

Сорбционная емкость биомассы исследованных грибов по двухвалентным ионам тяжелых металлов, как правило, убывала в ряду: Pb²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺ > Co²⁺ > Zn²⁺ > Ni²⁺ > Mn²⁺.

Однако предпочтительность сорбции по отдельным ионам варьировала в зависимости от видовой и штаммовой принадлежности грибов.

Ряд сорбируемости *T. hirsuta* 27 по ионам металлов показал предпочтительность связывания кадмия: $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+}$.

Для дальнейшего изучения сорбционных свойств ксилотрофных базидиомицетов были отобраны 4 культуры: *T. hirsuta* 27, имеющий высокое сродство со всеми исследованными катионами, *L. edodes* 185 и *G. lucidum* IBK 1608, характеризующиеся высокой селективностью по отношению к свинцу и кадмию и низким уровнем сорбции микроэлементов, а также *P. ostreatus* 43, несколько уступающий по связыванию свинца и кадмия вышеупомянутым культурам, но превосходящий их по скорости роста и выходу биомассы.

Изучение динамики процесса связывания тяжелых металлов на примере иона меди показало, что наиболее интенсивное связывание металлов происходит в первые 5 мин и через 20 мин инкубации процесс достигает равновесного состояния. Возможно, в первые минуты сорбция ионов металлов происходит по механизму быстро протекающего ионного обмена, затем включает и относительно замедленные процессы хелатирования (Gadd, Rome, 1988; Gadd, 1993).

Для лечебно-профилактических препаратов с сорбционными свойствами большое значение имеет способность связывать соединения не только катионной, но и анионной природы для выведения ионов (нитритов, нитратов) или полярных молекул, образующихся в желудочно-кишечном тракте (индол, скатол, гистамин, гуанидин, тиромин, путрецин), оказывающих токсическое действие на организм человека (Гальперин, Лазарев, 1986).

Для оценки анионообменных свойств грибной биомассы был использован метод потенциометрического титрования, основанный на анализе кривых титрования сорбента, которые строятся по данным pH раствора после порционного добавления кислоты или щелочи.

Потенциометрическое титрование образцов сухой биомассы отобранных видов грибов показало, что наряду со значительной катионообменной емкостью (E_k) они проявляют достаточно высокую анионообменную емкость (E_A), однако

соотношение этих параметров у разных культур было различным: у *T. hirsuta* 27 значения E_k и E_d были практически одинаковы (1,78 и 1,72 мг-экв/г соответственно), у *L. edodes* 185 E_k был в 1,5 раза меньше, чем E_d (1,3 и 2,0 мг-экв/г), у *P. ostreatus* 43 E_k превосходил E_d (1,4 и 0,9 мг-экв/г).

Высокая анионообменная емкость биомассы базидиальных грибов позволяет ей связывать значительные количества нитрат-ионов (рис. 69). Значительное содержание нитратов в продуктах питания и воде оказывает негативное действие на здоровье человека в связи со способностью микрофлоры кишечника трансформировать нитраты и токсичные нитриты. Полученные результаты свидетельствуют, о том, что сорбция нитрат-ионов мицелием исследованных видов грибов, в отличие от «Полифепана», увеличивается при высушивании при низких температурах. Особенно заметно это увеличение для биомассы *L. edodes* и *P. ostreatus* (рис. 69).

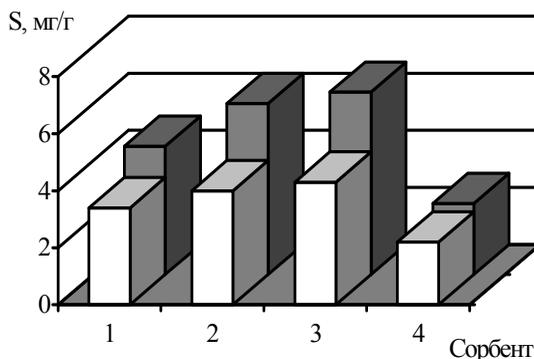


Рис. 69. Сорбция нитрат-ионов грибной биомассой после высушивания при температуре +60 °С – □ и -18 °С – ■:
1 – *Trametes hirsuta*; 2 – *Lentinus edodes*; 3 – *Pleurotus ostreatus*;
4 – «Полифепан»

Анионообменные свойства грибной биомассы значительно варьировали в зависимости от видовой и штаммовой принадлежности (см. рис. 69). Для связывания и выведения из организма токсичных соединений в лечебной практике чаще всего используют активированные угли, которые имеют ряд негативных свойств, например оказывают абразивное действие

на слизистую оболочку кишечника, закупоривают ворсинки, выводят из организма витамины и др. (Гальперин, Лазарев, 1986). Биосорбенты, как правило, лишены этих недостатков.

Основное участие в процессах сорбции принимают поры, сосредоточенные в микропористых зонах сорбентов (0,8-1,6 нм). Микропористые зоны частью своей поверхности образуют более крупные мезо- и макропоры, не играющие столь большой роли в сорбционных процессах. Поэтому наиболее эффективными детоксикантами являются энтеросорбенты с высокоразвитой микропористой структурой.

При изучении сорбционной активности энтеросорбентов по отношению к эндотоксинам, которыми чаще всего являются низкомолекулярные органические соединения, используют различные вещества-маркеры, наиболее часто – краситель метиленовый голубой. Оценка сорбционной активности биомассы отобранных грибов по метиленовому голубому показала, что поверхностные структуры грибного мицелия обладают высокоразвитой микропористой структурой. По данному показателю биомасса *P. ostreatus* 43 в 5 раз превосходит лигнинный сорбент «Полифепан» (рис. 70). При этом, как и в случае сорбции нитрат-ионов, сорбционная емкость биомассы увеличивалась при высушивании при низких температурах – для *P. ostreatus* в 4 раза (рис. 70).

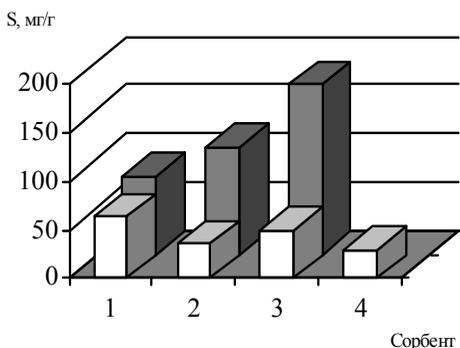


Рис. 70. Сорбционная емкость по метиленовому голубому грибной биомассы после высушивания при температурах +60 °C (□) и -18 °C (■)

1 – *Trametes hirsuta*; 2 – *Lentinus edodes*; 3 – *Pleurotus ostreatus*;

4 – «Полифепан»

Сорбционные свойства грибной клеточной стенки и её биополимеров

Ранее было выявлено, что биомасса многих ксилотрофных базидиомицетов отличается предпочтительностью связывания свинца по сравнению с другими двухвалентными металлами (Rovbel et al., 2001). Нативный мицелий ксилотрофных базидиомицетов, выращенный в условиях как глубинного, так и поверхностного культивирования, связывал свинец, как правило, в больших количествах, чем изолированные клеточные стенки. Лишь у мицелия *P. ostreatus* удаление цитоплазматического содержимого практически не повлияло на его сорбционную активность по отношению к ионам свинца. Наибольшей сорбционной емкостью по отношению к ионам данного металла отличалась биомасса грибов *T. hirsuta* и *G. lucidum* (рис. 71).

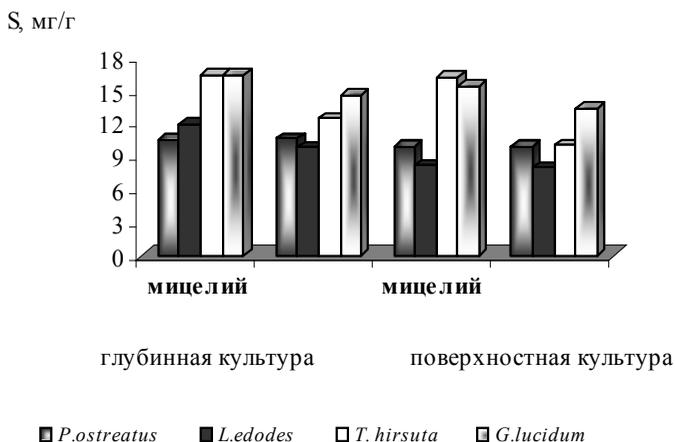


Рис. 71. Сорбционная емкость мицелия и клеточных стенок разных видов базидиомицетов по отношению к ионам свинца

Другой опасный поллютант, содержание которого в воздухе и почве непрерывно растет, – кадмий, характеризуется в отличие от свинца высокой подвижностью ионов. В растениях, выросших на загрязненных территориях, его содержание в десятки раз выше, чем на чистых почвах. Соединения кадмия вызывают онкологические заболевания и обладают терато-

генным действием. Хроническое поступление в организм кадмия приводит к заболеваниям печени, гортани, изменениям в костях, увеличивающим их хрупкость.

Сорбционная емкость биомассы ксилотрофных базидиомицетов по катиону кадмия в эквивалентном отношении близка к емкости свинца, а у отдельных культур даже превосходит его (рис. 71, 72).

Сорбционная емкость грибной биомассы по отношению к ионам кадмия значительно варьировала в зависимости от видовой принадлежности культуры (Ровбель, 2004).

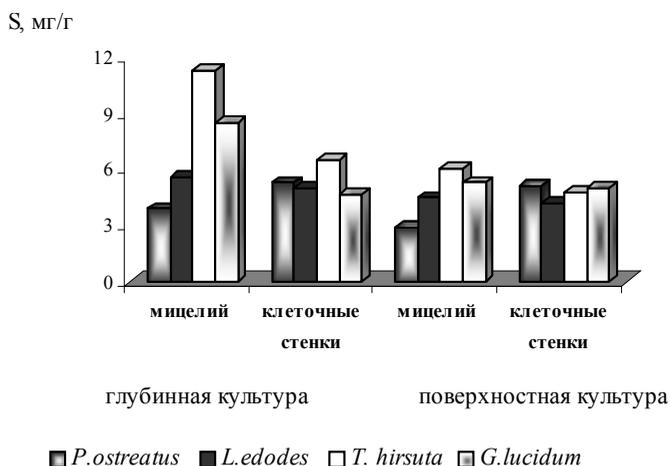


Рис. 72. Сорбционная емкость мицелия и клеточных стенок разных видов базидиомицетов по отношению к ионам кадмия

Наибольшую сорбционную активность проявил глубокий мицелий *T. hirsuta* (рис. 72). Клеточные стенки гриба связывали данный металл значительно слабее. У *P. ostreatus* наблюдалась обратная закономерность: сорбционная емкость клеточных стенок была выше, чем у мицелия в 1,4-1,8 раза. Нативный мицелий *G. lucidum*, *L. edodes* и *T. hirsuta*, выращенный в глубокой культуре, отличался повышенной способностью связывания кадмия по сравнению с поверхностной культурой. У клеточных стенок грибов значительных различий в сорбции иона кадмия не наблюдалось (рис. 72). Не отмечено

значительной разницы в показателях сорбции кадмия и свинца исследованными видами при различных способах их культивирования, кроме *T. hirsuta* и *G. lucidum*, глубинный мицелий которых имел более высокую сорбционную емкость кадмия, чем поверхностный (рис. 71, 72).

Одним из негативных последствий длительного использования большинства энтеросорбентов является выведение из организма элементов, необходимых для нормального развития организмов. Металлы, необходимые в малых дозах для нормальной жизнедеятельности (медь, цинк, никель, кобальт, марганец), в пересчете на эквивалентные количества сорбируются гораздо слабее, чем свинец или кадмий.

Так как значения сорбционной емкости биомассы ксилотрофных грибов по отношению к катионам данных металлов обычно очень близки, для оценки способности связывать металлы, относящиеся к микроэлементам, использовали сорбционную емкость по отношению к ионам меди.

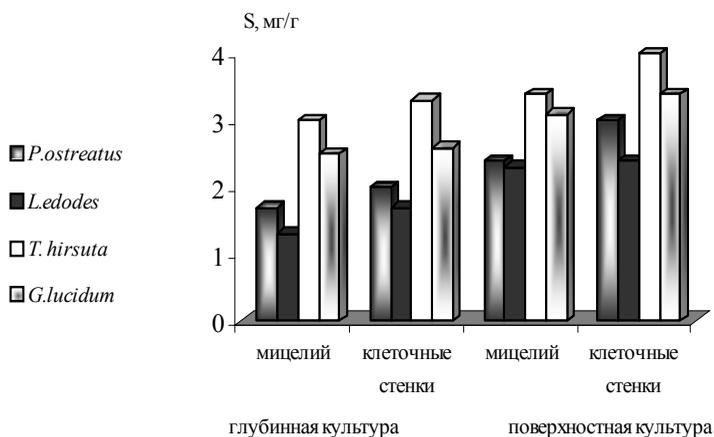


Рис. 73. Сорбционная емкость мицелия и клеточных стенок различных видов базидиомицетов по отношению к ионам меди

Обнаружено, что наименьшей сорбционной активностью по ионам меди обладает глубинный мицелий изученных грибов. Отделение клеточных стенок от других компонентов биомассы

способствовало усилению связывания данного металла. У поверхностного мицелия и выделенных из него клеточных стенок сорбционная емкость по иону меди была несколько выше, чем при глубинном выращивании (рис. 73).

Оценка сорбционной активности биомассы грибов по отношению к метиленовому голубому (вещество-маркер) показала, что изолированные клеточные стенки лучше сорбируют эндотоксины, чем нативный мицелий. Наибольшую активность по данному показателю выявили клеточные стенки и поверхностный мицелий гриба *P. ostreatus* (рис. 74).

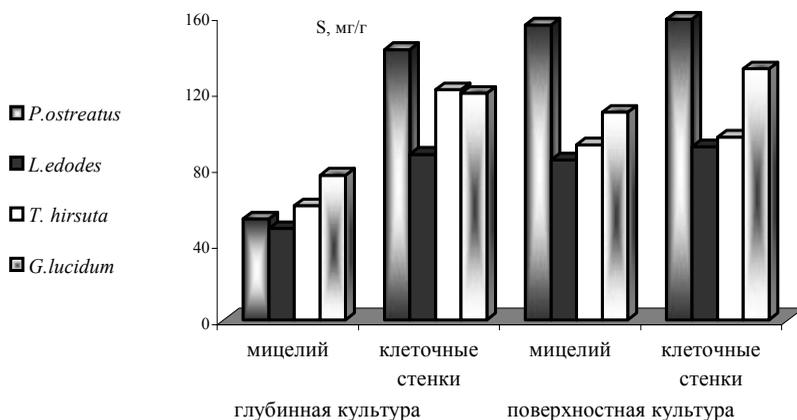


Рис. 74. Сорбционная емкость мицелия и клеточных стенок различных видов базидиомицетов по отношению к ионам метиленового голубого

Сорбционная способность грибов связана, в первую очередь, с клеточной стенкой, представляющей систему микрофибрилл, встроенных в аморфный матрикс (Siegel, 1990). В клеточной стенке базидиальных грибов различают несколько компонентов: аморфный глюкан, растворяющийся в холодной щелочи и содержащий α -1,3-связи; аморфный глюкан, содержащий глюкозные остатки, соединенные β -1,3 и β -1,4-связями; дискретный слой белка, микрофибриллы хитина, прочно связанные с щелоченерастворимым β -глюканом кова-

лентной связью и составляющие в нативном мицелии единый хитин-глюкановый комплекс (ХГК).

В клеточной стенке грибов содержатся также глюканы и небольшое количество протеинов. Эти полимеры могут быть в виде конъюгатов типа гликопротеинов или протеогликанов. Липиды в клеточной стенке часто отсутствуют или обнаруживаются в незначительном количестве (Елинов, 1989). Во многих случаях клеточная стенка содержит меланин, ионогенные группы различной природы и лиганды, способные связывать ионы тяжелых металлов. Однако участие в процессах сорбции определенных биополимеров клеточной стенки ксилотрофных базидиомицетов, механизмы связывания ионов тяжелых металлов исследованы очень мало.

С целью изучения роли полимеров клеточной стенки базидиальных грибов в связывании ионов тяжелых металлов удаляли отдельные компоненты, после чего анализировали сорбционную емкость по отношению к ионам меди. Клеточные стенки изученных грибов даже при кратковременном кипячении значительно снижали свою сорбционную активность (табл. 95).

Таблица 95. Влияние обработки клеточных стенок на сорбционную емкость по отношению к ионам меди (мг/г)

Вид, штамм	Обработка			
	Без обработки	Кипячение	Мерсеризация	Детергент
<i>Ganoderma lucidum</i> 1608	2,2	1,6	4,9	4,6
<i>Lentinus edodes</i> 185	1,8	1,3	3,5	3
<i>Trametes hirsuta</i> 27	3,1	2	5,1	5
<i>Pleurotus ostreatus</i> 43	2,3	1,3	4,2	3,9

Одним из наиболее распространенных и относительно дешевых способов обработки биомассы является щелочной гидролиз. Обработка грибной биомассы гидроокисью натрия при высоких температурах приводит к интенсивному снижению

в ней азотсодержащих веществ (белки, аминокислоты и др.) и нарушению надмолекулярной структуры. При обработке биомассы холодной NaOH (мерсеризация) содержание общего азота снижается незначительно, возрастает количество активных первичных центров и адсорбционная способность по отношению к воде и красителям (Канарская и др., 2000).

В наших исследованиях мерсеризация клеточных стенок также увеличивала сорбцию меди в 1,8-2,3 раза. Положительный эффект на сорбционную способность клеточных стенок показала и обработка детергентом (сульфанол) (табл. 95). Считается, что обработка детергентами приводит к удалению с поверхности клеточной стенки гидрофобного слоя, представленного в основном предельными углеводородами и восками (Феофилова и др., 1994).

К основным компонентам клеточной стенки можно отнести глюканы, различающиеся по растворимости в щелочах и химической структуре. Щелочерастворимые глюканы представлены в основном полимерами, имеющими α -1,3-связи. Щелочнерастворимые глюканы состоят из разветвленных в высокой степени соединений, имеющих β -1,3; β -1,6; β -1,4-связи (Ahrazem et al., 2001).

Удаление из клеточных стенок щелочерастворимых глюканов способствовало повышению сорбционной активности по отношению к ионам меди. Наиболее высокую сорбционную емкость имела щелочнерастворимая фракция (ХГК) гриба *T. hirsuta* (табл. 96). Ступенчатый кислотно-щелочной гидролиз, приводящий к разрушению ХГК и выделению чистого хитина, вызвал уменьшение сорбционной способности. Сорбционная емкость хитина, оставшегося после удаления щелочной фракции II, варьировала не столь значительно, как ХГК, оставшегося после удаления щелочной фракции I.

Роль белков клеточной стенки в связывании ионов тяжелых металлов изучали на примере *P. ostreatus*. Наиболее полно выделяли белки буферные системы на основе Тритона X-100 и SDS с меркаптоэтанолом. Удаление из матрикса клеточной стенки белковой компоненты способствовало повышению сорбционной емкости, вероятно, вследствие увеличения доступности функциональных групп микрофибрилл. Наблюдалась положительная корреляция между количеством выделенных белков и сорбционной емкостью (табл. 97).

Таблица 96. Сорбционная емкость клеточных стенок при ступенчатом удалении отдельных фракций полисахаридов

Вид, штамм	Сорбционная емкость по иону меди, мг/г			
	Нативные клеточные стенки	После удаления щелочной фракции I	После удаления кислотной фракции	После удаления щелочной фракции II
<i>Ganoderma lucidum</i> 1608	2,1	2,5	2,3	1,5
<i>Lentinus edodes</i> 185	1,7	2,3	1,5	1,3
<i>Trametes hirsuta</i> 27	3,2	3,6	3	1,7
<i>Pleurotus ostreatus</i> 43	2,4	2,8	1,9	1,4

Таблица 97. Сорбционная емкость клеточных стенок *Pleurotus ostreatus* по отношению к ионам меди после удаления белков

Обработка клеточных стенок	Количество выделенного белка, мг/г	Сорбционная емкость, мг/г
Контроль	-	2,3
Трис-буфер + тритон X-100	34,7	3,4
Трис-буфер + 1% SDS+ 0,1% МЭ	34,2	3,5
Трис-буфер + 1% SDS	14,5	3
Трис-буфер + 10% дезоксихолат Na	15	3
Трис-буфер + 1% твин-80	22,2	3,1
Трис-буфер	7,5	2,6

Исследование белков, выделенных из клеточной стенки, методом электрофореза в полиакриламидном геле показало их сходство независимо от способа выделения. У всех вариантов наблюдалось разделение на 4 фракции, из которых наибольшая доля (от 42 до 63%) приходилась на вторую, близкую по электрофоретическим свойствам альбумину с молекулярной

массой 69 кДа. Самая высокая сорбционная емкость наблюдалась в тех вариантах, где содержание данной фракции было наименьшим.

Таким образом, среди биополимеров клеточной стенки ксилотрофных базидиомицетов наиболее высокой сорбционной способностью обладает ХГК. Удаление компонентов матрикса способствует повышению сорбционной активности.

Сорбционные свойства хитин-глюканового комплекса грибов в зависимости от условий культивирования

Сорбционные свойства грибной биомассы во многом определяются надмолекулярной структурой, качественным и количественным составом биополимеров клеточной стенки, зависящих от физиологического состояния гриба. На способность ХГК связывать ионы тяжёлых металлов влияют компоненты питательной среды и условия культивирования.

Как показали наши исследования, наиболее высокой сорбционной активностью по отношению к ионам меди и повышенным содержанием клеточных стенок обладал глубинный мицелий *G. lucidum* 1608 и *P. ostreatus* 43, выращенный на среде с лактозой. Этот источник углерода имел преимущества и по накоплению биомассы (табл. 98). Изменение концентрации лактозы в среде от 10 до 30 г/л значительно увеличило выход биомассы *G. lucidum* 1608 и *P. ostreatus* 43, а также содержание клеточных стенок. Сорбционная активность по отношению к ионам меди также повысилась, причем у биомассы более значительно.

Высшие базидиальные грибы способны усваивать в процессе метаболизма азот различного происхождения, органический азот обычно усваивается более эффективно, чем минеральный. Максимальные значения всех исследуемых параметров обеспечивал дрожжевой экстракт (табл. 99). В наибольшей степени от источника азота зависел выход биомассы, в наименьшей – сорбционная емкость клеточных стенок и ХГК (табл. 99). Изменение концентрации дрожжевого экстракта с 1 до 4 г/л приводило к увеличению выхода биомассы и содержания в ней клеточных стенок в 2 раза.

Самый высокий выход биомассы получен на среде с начальным рН 6-6,5, клеточных стенок и ХГК – в более широком

диапазоне pH 5-7. Максимум сорбционной активности биомассы наблюдался в слабокислой и нейтральной средах, клеточных стенок и ХГК – в диапазоне pH от 6 до 6,5. Так как эффективность связывания ионов металлов сорбентами зависит от количества доступных для связывания функциональных групп в поверхностных структурах, можно предположить, что данные условия обеспечивают наибольшую степень их диссоциации.

На основании результатов исследования для получения глубинной биомассы с повышенным содержанием ХГК и, соответственно, высокой сорбционной активностью предложена лактозно-дрожжевая питательная среда следующего состава (г/л): лактоза – 30, дрожжевой экстракт – 4, K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25, pH 6,5.

По сравнению с исходной глюкозо-пептонной средой на оптимизированной среде выход биомассы грибов возрос в 1,3-1,7 раза, содержание ХГК увеличилось в 1,4-2,1 раза, сорбционная емкость биомассы по отношению к ионам меди – в 1,2-1,6 раза, сорбционная активность ХГК сохранилась практически на том же уровне. В ходе культивирования грибов в лабораторных ферментерах содержание клеточных стенок и сорбционная активность биомассы увеличивались, достигая максимальных значений в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста через 96-108 ч культивирования для *G. lucidum* (рис. 75, а) и 72-84 ч для *P. ostreatus* (рис. 75, б).

В числе наиболее эффективных мер предотвращения накопления радионуклидов в организме и ускоряющих их выделение признано регулярное потребление продуктов, содержащих биополимеры с сорбционными свойствами. К сожалению, богатая пищевыми волокнами сельскохозяйственная продукция, выращенная на загрязненных территориях, не может быть использована для этих целей, поэтому весьма актуальной является задача получения энтеросорбентов на основе экологически чистого сырья, выращенного в искусственных условиях (Милевич, Конопля, 2003).

Таблица 98. Влияние источника углерода на содержание биомассы, клеточных компонентов и сорбционную емкость (S) меди *Ganoderma lucidum* 1608 и *Pleurotus ostreatus* 43

Вид, штамм	Источник углерода	Биомасса, г/л	Биомасса, S мг/г	Содержание клеточных стенок, %	Клеточные стенки, S мг/г	Содержание ХГК, %	ХГК, S мг/г
<i>G. lucidum</i> 1608	Глюкоза	6,18+0,37	2,28+0,13	12,06+0,72	2,68+0,15	8,17+0,5	4,95+0,28
	Сахароза	6,76+0,41	2,42+0,15	12,37+0,88	2,74+0,17	8,50+0,61	4,89+0,26
	Лактоза	7,47+0,45	2,56+0,17	14,17+0,85	2,84+0,20	8,90+0,72	4,96+0,26
	Крахмал	6,53+0,4	1,45+0,11	10,67+0,77	2,53+0,17	6,53+0,4	4,82+0,26
<i>P. ostreatus</i> 43	Глюкоза	9,83+0,67	1,74+0,1	21,30+1,27	2,44+0,14	9,38+0,69	4,41+0,22
	Сахароза	9,17+0,51	1,71+0,11	19,61+1,12	2,38+0,13	9,06+0,5	4,51+0,23
	Лактоза	10,68+0,72	1,91+0,11	22,66+1,35	2,57+0,16	10,46+0,7	4,56+0,23
	Крахмал	11,86+0,75	1,62+0,12	16,48+1,02	2,26+0,14	7,75+0,45	4,45+0,22

Таблица 99. Влияние источников азота на содержание биомассы, клеточных компонентов и сорбционную емкость (S) меди *Ganoderma lucidum* 1608 и *Pleurotus ostreatus* 43

Вид, штамм	Источник азота	Биомасса, г/л	Биомасса, S мг/г	Содержание клеточных стенок, %	Клеточные стенки, S мг/г	Содержание ХГК, %	ХГК, S мг/г
<i>G. lucidum</i> 1608	Пептон	7,31±0,44	2,41±0,15	15,34±0,92	2,48±0,15	7,41±0,44	4,95±0,25
	Дрожжевой экстракт	8,54±0,48	2,52±0,16	16,41±0,98	2,62±0,18	8,24±0,51	5,00±0,27
	Мочевина	4,07±0,36	2,24±0,12	13,9±0,82	2,36±0,12	6,52±0,39	4,88±0,24
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,51±0,15	1,29±0,07	6,7±0,4	2,06±0,1	3,11±0,2	4,6±0,21
	NH ₄ NO ₃	2,20±0,12	1,15±0,05	6,33±0,35	2,02±0,1	2,94±0,17	4,53±0,22
	Na NO ₃	2,04±0,11	1,07±0,05	6,11±0,31	2,01±0,09	2,78±0,15	4,5±0,22
<i>P. ostreatus</i> 43	Пептон	6,80±0,36	1,91±0,11	20,89±1,25	2,43±0,14	7,86±0,47	4,71±0,24
	Дрожжевой экстракт	12,18±0,7	2,09±0,13	22,31±1,32	2,54±0,16	8,42±0,54	4,77±0,25
	Мочевина	5,21±0,32	1,72±0,1	18,64±1,15	2,24±0,12	7,10±0,36	4,55±0,23
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,54±0,17	1,2±0,06	12,41±0,74	2,03±0,09	5,63±0,33	4,42±0,23
	NH ₄ NO ₃	2,20±0,12	1,16±0,06	11,20±0,66	1,99±0,09	5,50±0,3	4,40±0,22
	Na NO ₃	1,92±0,1	1,09±0,05	11±0,61	1,96±0,09	5,38±0,27	4,33±0,21

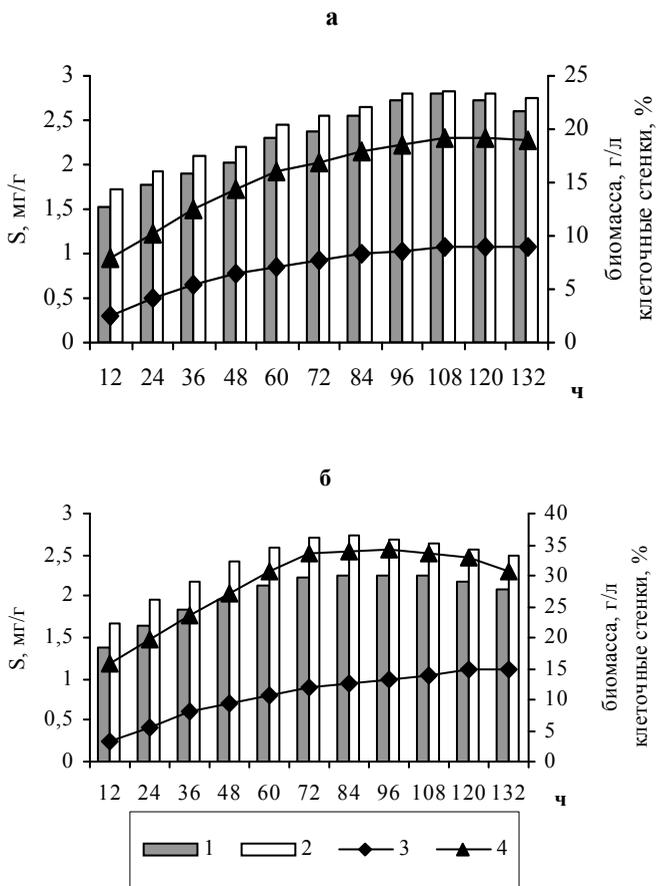


Рис. 75. Влияние длительности культивирования на выход биомассы, клеточных стенок и сорбционную (S) активность по отношению к ионам меди *Ganoderma lucidum* (а) и *Pleurotus ostreatus* (б):
 1 – S биомассы (мг/г); 2 – S клеточных стенок (мг/г); 3 – выход биомассы (г/л); 4 – содержание клеточных стенок (%)

Для изучения сорбционной способности глубинного мицелия, клеточных стенок и ХГК грибов по отношению к стронцию использовали его стабильный изотоп стронций-88, так как в

условиях *in vitro* сорбционные характеристики сорбента не зависят от изотопного состава сорбата.

Установлено, что сорбирующая способность нативной биомассы различных грибов по отношению к данному металлу значительно варьирует, сорбционная емкость *G. lucidum* оказалась в 3 раза выше, чем у *T. hirsuta* (3,53 и 1,25 мг/г соответственно). Сорбционная емкость клеточных стенок различных грибов, напротив, имела близкие значения. ХГК стабильно связывал 1,4-1,5 мг Sr/г. Сорбция стронция клеточными стенками была на 10-20% выше, чем ХГК (табл. 100). По способности связывать ионы стронция исследованные грибы в 2-5 раз превосходили коммерческий энтеросорбент «Полифепан».

Таблица 100. Сорбционная емкость биомассы и ее компонентов по отношению к стронцию-88

Вид, штамм	Сорбционная емкость, мг/г		
	Биомасса	Клеточные стенки	ХГК
<i>Trametes hirsuta</i> 27	1,25	1,77	1,38
<i>Ganoderma lucidum</i> 1608	3,53	1,59	1,43
<i>Pleurotus ostreatus</i> 43	1,82	1,98	1,55
<i>Lentinus edodes</i> 185	1,50	1,91	1,52
«Полифепан»	0,74		

Так как биомасса грибов, выращенных на лактозодрожжевой среде, характеризуется повышенной сорбционной емкостью по отношению к свинцу и кадмию, предпочтительность связывания которых сохраняется и в отношении к стронцию, она может быть использована в качестве субстанции лечебно-профилактических средств, предназначенных для выведения из организма радиоуклидов и тяжелых металлов. Сорбционная емкость такой грибной биомассы, а также её компонентов в 3,9-7,6 раза превосходила известный энтеросорбент «Полифепан» и по метиленовому голубому, приближая их к лучшим препаратам нового класса угольно-волокнистых сорбентов.

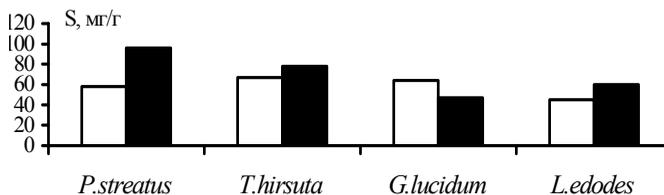


Рис. 76. Сорбция аммиака биомассой и клеточными стенками различных видов грибов: □ – мицелий; ■ – клеточные стенки

Биомасса и клеточные стенки грибов показали способность связывать токсичные продукты белкового распада, в частности аммиак. Клеточные стенки большинства грибов обладали более высокой сорбционной емкостью по отношению к аммиаку, чем мицелий, только у *G. lucidum* наблюдалась обратная закономерность (рис. 76). По способности связывать аммиак клеточные стенки *P. ostreatus* (96,8 мг/г) близки к торфяным сорбентам, специально разработанным для очистки воздуха животноводческих помещений от токсичных газов (Томсон, 2004).

Сопоставление ИК-спектров биомассы и клеточных стенок *G. lucidum* и *P. ostreatus* с их аммиачными формами показало, что в данном случае имеет место не только поглощение газа микрокапиллярными структурами, но и химическое связывание.

Появление плеча в области 1740 см^{-1} у клеточных стенок *P. ostreatus* и 1745 см^{-1} у клеточных стенок *G. lucidum*, уменьшение полос поглощения, характерных для амидной группировки ($1550, 1650\text{ см}^{-1}$) свидетельствуют об увеличении степени деацетилирования хитина после замещения ацетамидных групп аминогруппами. Наличие у аммиачных форм новой полосы поглощения в области 1250 см^{-1} свидетельствует о появлении новых сложноэфирных связей (рис. 77).

Таким образом, способность биомассы базидиальных грибов связывать ионы тяжёлых металлов коррелирует с содержанием хитин-глюканового комплекса и определяется составом питательных сред и условиями культивирования. В условиях экспериментов *in vitro* показано, что мицелий, клеточные стенки и

ХГК базидиомицетов обладают радиопротекторными свойствами.

Сорбционная характеристика плодовых тел и вегетативного мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus*

Изучение способности штаммов *P. ostreatus* извлекать медь из растворов показало наличие сорбционных свойств как у плодовых тел, так и у глубинного мицелия всех исследуемых штаммов. Эти штаммы были проверены на способность связывать ионы свинца и кадмия, которые по своей токсичности входят в число поллютантов, наиболее опасных для здоровья человека. Содержание их в пищевых продуктах (ПДК) не должно превышать 0,5 и 0,05 мг/кг соответственно. Для исследования сорбционной способности гриба использовали разбавленные 0,25 мМ растворы, содержащие 51 мг/л свинца и 28 мг/л кадмия, моделирующие поступление этих элементов в организм человека с водой и загрязненными продуктами питания.

Известно, что штаммы *P. ostreatus* по скорости роста мицелия в глубинной культуре и выходу биомассы превосходят большинство культивируемых ксилотрофных базидиомицетов. Сорбционные свойства этих грибов характеризуются высокой вариабельностью. Из четырех штаммов лучше других извлекали свинец и кадмий *P. ostreatus* 5 и 10. Сорбционный потенциал глубинной биомассы незначительно отличался от такового плодовых тел (табл. 101).

Наряду с величиной сорбционной емкости важной характеристикой сорбционного потенциала сорбентов является селективность (предпочтительность) сорбции ионов тяжелых металлов из растворов. Для оценки поглотительной способности и селективности сорбентов в отношении тяжелых металлов широко используется коэффициент распределения K_d , характеризующий соотношение концентраций вещества в жидкой и твердой фазе. При $K_d < 1$ сорбент обеднен, при $K_d > 1$ он обогащен веществом по сравнению с равновесным раствором. Сорбенты, имеющие $K_d > 500$, рекомендуется использовать для концентрирования ионов металлов из растворов в статических и динамических условиях.

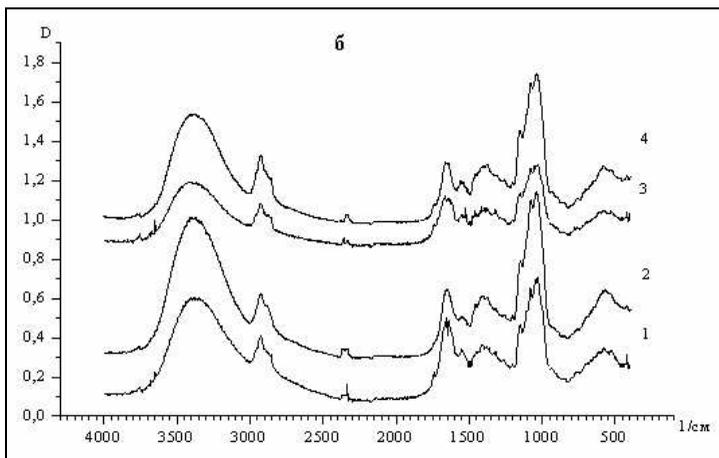
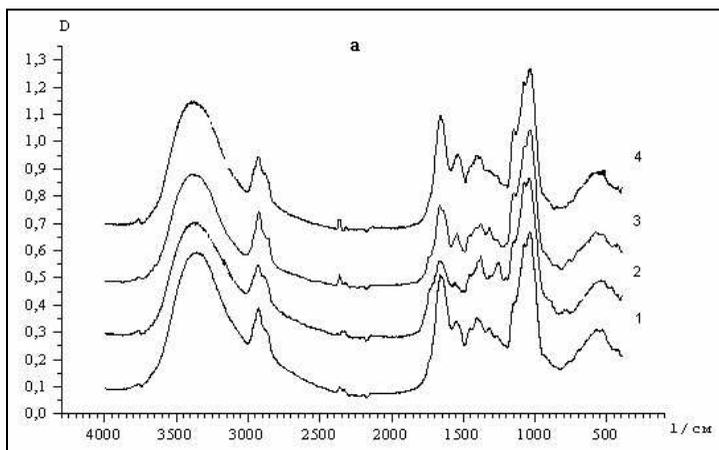


Рис. 77. ИК-спектры биомассы и клеточных стенок *Ganoderma lucidum* (а) и *Pleurotus ostreatus* (б) до и после сорбции аммиака: 1 – биомасса; 2 – аммиачная форма биомассы; 3 – клеточные стенки; 4 – аммиачная форма клеточных стенок

Марганец, кобальт, никель, медь и цинк, токсичные в относительно высоких концентрациях, относят к микроэлементам, которые в малых количествах необходимы для нормального функционирования организма.

Таблица 101. Сорбция ионов тяжелых металлов из разбавленных растворов мицелием и плодовыми телами штаммов *Pleurotus ostreatus*, мг/г

Ион	<i>P. ostreatus</i> 5		<i>P. ostreatus</i> 10		<i>P. ostreatus</i> 15		<i>P. ostreatus</i> 35	
	М*	ПТ**	М	ПТ	М	ПТ	М	ПТ
Co ²⁺	1,4	1,6	1,3	1,5	0,8	1,0	0,7	0,9
Zn ²⁺	1,7	1,9	1,2	1,5	1,2	1,4	0,5	0,7
Ni ²⁺	1,5	1,7	1,2	1,4	1,0	1,3	0,4	0,7
Pb ²⁺	10,8	11,3	10,7	11,4	8,5	10,0	7,7	8,6
Mn ²⁺	1,3	1,5	0,8	1,1	0,6	0,8	0,5	0,8
Cu ²⁺	1,9	2,0	1,5	1,8	1,3	1,5	0,8	1,0
Cd ²⁺	3,9	4,2	3,2	3,5	3,0	3,4	2,9	3,3
Fe ³⁺	3,3	3,8	3,5	3,7	2,0	2,8	2,4	2,9

* – Мицелий; ** – плодовые тела.

Так как коэффициенты распределения для катионов данных металлов не превышали 400, в случае одновременного присутствия в смеси этих тяжелых металлов, что наиболее часто встречается в реальных условиях, ионы кадмия и свинца связываются в первую очередь и лишь затем – ионы микроэлементов.

Биомасса *P. ostreatus*, как и других базидиомицетов, характеризуется высокой селективностью извлечения металлов. Сорбционная активность *P. ostreatus* по отношению к металлам, необходимым в низких концентрациях для нормального функционирования систем и органов человека (Mn, Cu, Zn, Co, Ni) (Ровбель, 2004), была ниже, чем у коммерческого лигнинового энтеросорбента «Полифепан», а к токсикантам (свинцу и кадмию) – значительно выше (табл. 102).

Сравнительная оценка сорбционной активности гриба (плодовых тел и глубинного мицелия) к наиболее распространённым тяжёлым металлам показала, что *P. ostreatus* характеризуется предпочтительностью связывания опасных токсикантов – свинца, кадмия и индифферентностью к основным биогенным элементам.

Таблица 102. Сорбционная (СОЕ) емкость тяжёлых металлов мицелием (М) и плодовыми телами (ПТ) штаммов *Pleurotus ostreatus*, мг-экв /г

Ион	<i>P. ostreatus</i> 5		<i>P. ostreatus</i> 10		«Поли-фепан»
	М	ПТ	М	ПТ	
Co ²⁺	0,05	0,07	0,05	0,09	0,04
Zn ²⁺	0,06	0,09	0,06	0,08	0,04
Ni ²⁺	0,02	0,04	0,01	0,05	0,06
Pb ²⁺	0,11	0,15	0,12	0,17	0,07
Mn ²⁺	0,02	0,04	0,03	0,05	0,03
Cu ²⁺	0,05	0,06	0,04	0,05	0,06
Cd ²⁺	0,08	0,09	0,09	0,11	0,05
Диапазон СОЕ	0,02-0,15	0,02-0,11	0,01-0,12	0,05-0,17	0,03-0,07

Изучение динамики процесса связывания тяжелых металлов на примере иона меди показало, что более интенсивное связывание металлов происходит в первые 5 мин и через 20 мин инкубации процесс достигает равновесного состояния. Возможно, в первые минуты сорбция ионов металлов происходит по механизму быстро протекающего ионного обмена, затем включает и относительно замедленные процессы хелатирования (Соколова и др., 2005).

Максимальное связывание свинца *P. ostreatus* наблюдалось при pH 8,2-8,5 (рис. 78), что соответствует кислотности кишечника человека (Гальперин, Лазарев, 1986).

Ряд сорбируемости *P. ostreatus* по ионам металлов показал предпочтительность связывания свинца: Pb²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Ni²⁺ > Mn²⁺.

Сорбционная способность грибов связана, в первую очередь, с клеточной стенкой, которая представляет собой систему микрофибрилл, встроенных в аморфный матрикс (Ровбель и др., 2004). В клеточной стенке базидиальных грибов обычно различают несколько компонентов: аморфный глюкан, растворяющийся в холодной щелочи и содержащий α-1,3-связи; аморфный глюкан, содержащий глюкозные остатки, соединенные β-1,3- и β-1,4-связями; дискретный слой белка, микро-

фибриллы хитина, прочно связанные с щелоченерастворимым β -глюканом ковалентной связью и составляющие в нативном мицелии единый хитин-глюкановый комплекс (ХГК).

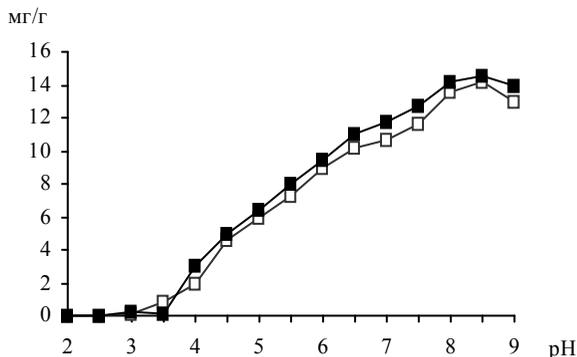


Рис. 78. Влияние pH на сорбцию свинца *P. ostreatus*:

□ – мицелий, ■ – плодовые тела

Микрофибриллы хитина составляют структурную основу клеточной стенки. Гидроксильные группы могут участвовать в образовании внутри- и межмолекулярных водородных связей, стабилизирующих пространственную структуру. Геометрическая площадь микрофибрилл хитина достигает 1000 м^2 в 1 г клеточных стенок. Небольшие расстояния между микрофибриллами (5-10 нм) гарантируют высокую вероятность захвата ионов тяжелых металлов клеточной стенкой (Горовой, Косяков, 1996). Сорбционная способность хитина в значительной степени зависит от содержания аминокрупп, достигая максимума при степени деацетилирования 50-60% (Ровбель, Гончарова, 2004).

В клеточной стенке грибов содержатся также глюканы и небольшое количество протеинов. Эти полимеры могут быть в виде конъюгатов типа гликопротеинов или протеогликанов. Липиды в клеточной стенке часто отсутствуют или обнаруживаются в незначительном количестве. Во многих случаях клеточная стенка содержит меланин. Биополимеры клеточной стенки содержат ионогенные группы различной природы и лиганды, способные связывать ионы тяжелых металлов. Однако

участие в процессах сорбции определенных биополимеров клеточной стенки ксилотрофных базидиомицетов, механизмы связывания ионов тяжелых металлов исследованы недостаточно.

С целью изучения роли полимеров клеточной стенки базидиальных грибов в связывании ионов тяжелых металлов проводили удаление отдельных компонентов обработкой различными способами, после чего анализировали сорбционную емкость по отношению к ионам меди. Одним из наиболее распространенных и относительно дешевых способов обработки биомассы является щелочной гидролиз. Обработка грибной биомассы гидроокисью натрия при высоких температурах приводит к интенсивному снижению в ней азотсодержащих веществ (белки, аминокислоты и др.) и нарушению надмолекулярной структуры. При обработке биомассы холодной NaOH (мерсеризация) содержание общего азота снижается незначительно, возрастает количество активных первичных центров и адсорбционная способность по отношению к воде и красителям.

Исследования проведены на модели двух штаммов *P. ostreatus*. Мерсеризация клеточных стенок увеличивала сорбционную способность с 2,3-2,5 (глубинный мицелий) и 2,7-3 (плодовые тела) до 4,2-4,5 и 5-5,2 мг/г соответственно. Повышению сорбционной активности грибов способствует и удаление из клеточных стенок щелочерастворимых глюканов, после чего остаются щелоченерастворимые, а именно ХГК. С ХГК связаны белковые компоненты клеточной стенки. Удаление их из матрикса способствовало повышению сорбционной ёмкости, что связано, очевидно, с увеличением доступности функциональных групп микрофибрилл.

Сравнительное изучение сорбционной способности клеточных стенок грибов и их структурных биополимеров по отношению к ионам различных тяжелых металлов (медь, кадмий, свинец) показало доминирующую роль ХГК в сорбционных процессах. Он превосходил клеточные стенки на 40% по иону меди и кадмию и на 30% по иону свинца. Ступенчатый кислотно-щелочной гидролиз, приводящий к разрушению ХГК и выделению чистого хитина, вызывал уменьшение сорбционной активности. Таким образом, среди биополимеров клеточной

стенки наиболее высокой сорбционной способностью обладает ХГК.

Грибы могут сорбировать не только тяжёлые металлы, но и радионуклиды, эндогенные токсины. Для изучения сорбционной способности плодовых тел и мицелия, клеточных стенок и ХГК гриба по отношению к стронцию использовали его стабильный изотоп стронций-88, так как в условиях *in vitro* сорбционные характеристики сорбента не зависят от изотопного состава сорбата.

Установлено, что сорбирующая способность нативной биомассы как плодовых тел, так и глубинного мицелия *P. ostreatus* несколько ниже таковой клеточных стенок, но выше ХГК (табл. 103). По способности связывать ионы стронция гриб *P. ostreatus* значительно превосходил коммерческий энтеросорбент «Полифепан».

Одним из требований, предъявляемых к сорбентам, используемым при различных видах детоксикации, является избирательное удаление из биологических жидкостей токсических продуктов, которые объединяют терминами «среднемолекулярные олигопептиды», «средние молекулы». Общепризнанным маркером сорбции таких соединений является краситель метиленовый голубой.

Таблица 103. Сорбция ионов стронция плодовыми телами и мицелием штаммов *Pleurotus ostreatus*, мг/г

Штамм	Биомасса	Клеточные стенки	ХГК
<i>P. ostreatus</i> 5			
Плодовые тела	2,05	2,24	1,8
Глубинный мицелий	1,82	1,98	1,55
<i>P. ostreatus</i> 10			
Плодовые тела	2,1	2,35	1,95
Глубинный мицелий	1,93	2,19	1,63
«Полифепан»	0,4		

При описании сорбционных характеристик широко используемого энтеросорбента «Полифепан» указывается, что он имеет сорбционную емкость по метиленовому голубому не

ниже 16 мг/г. В проверенной нами партии этот показатель был в 1,5 раза выше. Плодовые тела и мицелий *P. ostreatus* превосходили «Полифепан» в 3-7 раз (табл. 104) (Ровбель, Гончарова, 2005).

Таблица 104. Сорбция по метиленовому голубому плодовыми телами и мицелием штаммов *Pleurotus ostreatus*, мг/г

Штамм	Биомасса	Клеточные стенки	ХГК
<i>P. ostreatus</i> 5			
Плодовые тела	85	145	210
Глубинный мицелий	76	128	190
<i>P. ostreatus</i> 10			
Плодовые тела	97	156	221
Глубинный мицелий	83	132	202
«Полифепан»	29		

Таким образом, в условиях экспериментов *in vitro* показано, что плодовые тела и глубинный мицелий гриба *P. ostreatus* обладают радиопротекторными свойствами и способностью выводить из организма токсины эндогенного происхождения (Бисько и др., 2004).

Способность грибной биомассы и ее структурных компонентов связывать ионы тяжелых металлов в значительной степени определяется влажностью и условиями сушки. В максимальной степени сорбционный потенциал проявляется при влажности биомассы 60-80%, ХГК 40% и более. Низкотемпературная сушка позволяет сохранить высокую сорбционную активность гриба при относительно низкой влажности. Снижение влажности клеточных стенок с 60 до 10% в условиях сушки при температуре -10 °С уменьшает их сорбционную емкость по отношению к ионам меди на 30-35%, а при 50 °С данный показатель снижается более чем в 3 раза. При полном высушивании ХГК в условиях низких температур его сорбционная емкость составляет 84% максимального уровня (рис. 79). Таким образом, оптимальной для сорбции меди биомассой, клеточными стенками и хитин-глюкановым комплексом *P. ostreatus* оказалась низкотемпературная сушка.

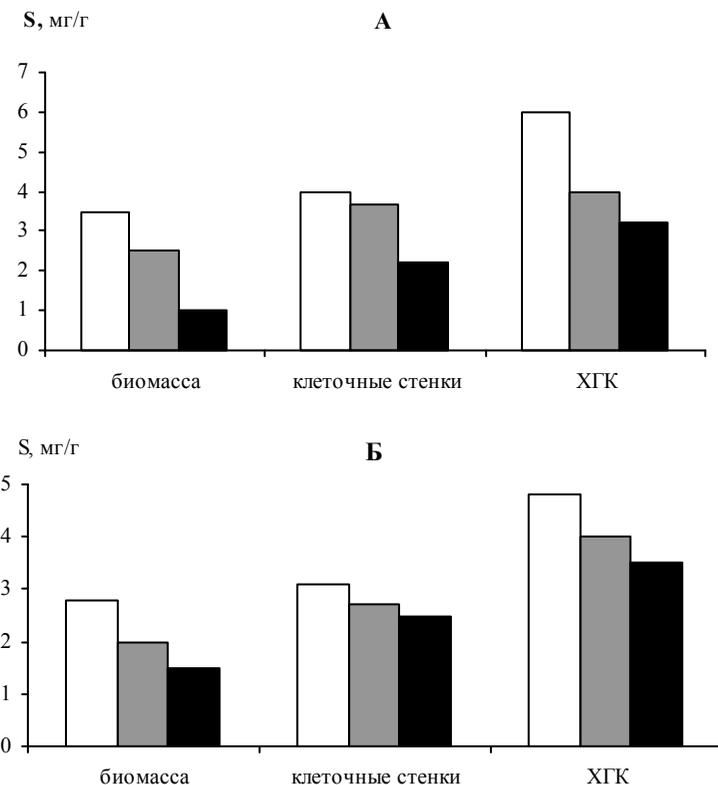


Рис. 79. Сорбция по отношению к ионам меди биомассы, клеточных стенок и хитин-глюканового комплекса *Pleurotus ostreatus*, высушенных при температуре: ■ – +50 °C; ▒ – +20 °C и □ – –10 °C до влажности 60%. А – плодовые тела; Б – глубинный мицелий

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований отобраны новые штаммы *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 – перспективные продуценты меланиновых пигментов. На основании изучения физиолого-биохимических особенностей этих штаммов оптимизированы состав питательных сред и условия глубинного культивирования грибов-продуцентов, обеспечивающие стабиль-

ную продукцию пигментов. Оптимальными для роста и синтеза меланинов являются: исходный рН среды 6-8, температура 25-27 °С, аэрация 0,325-0,55 г О₂/л·ч, что позволяет повысить выход продукции меланина в 2,5-3 раза. Общий выход меланина в таких условиях достигал 2,7-3,6 г/л, эндомеланина – 1,4-1,6 г/л, экзомеланина – 1,3-1,9 г/л, биомассы – 8,5 и 9 г/л для *I. obliquus* В-26 и *Ph. robustus* М-10 соответственно .-

На основании результатов изучения физических и химических свойств препаративных форм эндо- и экзопигментов изучаемых видов грибов они отнесены к истинным меланинам. Исследование элементного состава пигментов показало, что содержание в них углерода составляет 37-38%, водорода – 5-5,5%, азота – 5,1-5,8% и кислорода – 50,5-53% для *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 соответственно. Меланины содержат функциональные группы (%): алифатические гидроксилы – 15-15,7, фенольные гидроксилы – 1,3-1,9, карбонильные – 1,1-2,6, карбоксильные радикалы – 0,9-1,2, метоксильные – 1 и следовые количества для *I. obliquus* В-26 и *Ph. robustus* М-10 соответственно. Молекулярная масса меланиновых пигментов *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 находилась в пределах 55±5 кДа. Концентрация ПМЦ в меланинах исследуемых видов грибов составила 4,5×10¹⁷ – 4,6×10¹⁷ спин/г, что характеризует их высокие антиоксидантные и генопротекторные свойства.

Показано, что эндо- и экзомеланины *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 являются меланопротеинами с содержанием аминокислот в эндомеланинах 24,7 и 32%, в экзомеланинах – 27,4 и 36,4% соответственно. Установлено, что внутриклеточные и внеклеточные пигменты изучаемых грибов близки между собой по молекулярным массам, оптическим свойствам, элементному составу, содержанию функциональных групп и спектральным характеристикам .

Выявлен новый ингибитор меланиногенеза у исследуемых видов грибов – койевая кислота, на 70-75% подавляющая активность полифенолоксидазного комплекса. Установлено, что образование меланина у *Ph. robustus* М-10 и *I. obliquus* В-26 происходит по шикиматному пути, промежуточным продуктом которого является параоксibenзойная кислота. Протокатеховая кислота, являясь основным продуктом щелочного плавления

меланиновых пигментов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26, указывает на их принадлежность к пирокатехиновому типу.

Полученный глубинный мицелий меланинсинтезирующих грибов *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 и выделенные из него меланиновые пигменты обладают высокой сорбционной емкостью по отношению к ионам тяжелых металлов, в частности свинцу, меди, цинку, никелю. Эффективная сорбция ионов тяжелых металлов меланинами *Ph. robustus* M-10 и *I. obliquus* B-26 осуществляется в широком интервале (15-30 °С) температур при нейтральном (6) значении pH среды.

Доказано, что глубинный мицелий и выделенные из него меланины обладают высоким сродством к свинцу, одному из наиболее распространенных и опасных для здоровья людей поллютантов. Сорбционная емкость меланина *Ph. robustus* M-10 в отношении исследованных металлов значительно превосходит (в 1,3-1,4 раза) таковую меланина *I. obliquus* B-26. В основе сорбции металлов меланинами лежит взаимодействие катионов металлов с карбоксильными группами по ионному типу, а также координационная связь с функциональными группами алифатических цепей пигментов.

Проведен скрининг ксилотрофных базидиомицетов – продуцентов полисахаридов. Установлено, что макромицеты *L. edodes*, *G. lucidum* и *C. schevczenkovi* в условиях глубинного культивирования синтезируют до 10% эндополисахаридов и до 4 г/г экзополисахаридов. В глубинном мицелии грибов кроме полисахаридов содержится значительное количество белка (до 26%), липидов (9-10%), фенольных соединений и других биологически активных соединений.

Данные по углеводному составу глубинного мицелия ксилотрофных базидиомицетов свидетельствуют о том, что общее содержание их достигает 34,66-57,57%. Свободные сахара цитозоля составляют 6,72-25,44%. Основная часть данной фракции у всех грибов представлена глюкозой, трегалозой и полиолами. Преобладающим полиолом у всех исследованных видов грибов является маннит. Структурно-функциональные полисахариды составляют 3,2-7,8%, структурные – 20,14-32,7%. Структурные компоненты клеточной стенки представлены кислоторастворимыми, щелочерастворимыми фракциями и хитином. Результаты ГЖХ и ИК-спектроскопии позволили отнести структурные полисахариды к гетеро- и гомоглюканам с

β - и α -гликозидными типами связей. Установлено, что по содержанию структурно-функциональных полисахаридов и углеводных протекторов глубинный мицелий превосходит плодовые тела в 1,5-2 раза.

Оптимизация условий культивирования позволяет значительно увеличить выход полисахаридов – синтез экзополисахаридов увеличивается на 29-58%, эндополисахаридов – на 17-32%. Наибольший выход эндополисахаридов получен при соотношении С : N, близком к 18, экзополисахаридов – к 25. Максимальному накоплению биомассы и полисахаридов способствует температура 25-30 °С, исходный pH среды 5-6. Оптимальное соотношение между ростом грибов, образованием полисахаридов и технологическими параметрами стадии выделения полисахаридсодержащей биомассы достигается при аэрации 1-1,5 л/л-мин и перемешивании 100 об/мин.

Результаты анализа физико-химических свойств, структуры и конфигурации полисахаридов глубинного мицелия и культурального фильтрата исследованных видов грибов показали, что кинематическая вязкость 0,1% растворов экзополисахаридов колеблется в пределах 1,2-3,2 мм²/с, эндополисахаридов – 1-1,1 мм²/с, удельное вращение плоскости поляризации $[\alpha]_D^{20}$ – от -25° до $+130^\circ$. Полисахариды *L. edodes*, *G. lucidum* и *S. schevczenkovi* являются пептидогликанами с содержанием белка 1,2-8,2%, их молекулярные массы составляют от 10 до 200-500 кДа. По углеводному составу эндополисахариды *G. lucidum* и *L. edodes* – гетерогликаны, основные мономеры – D-глюкоза, D-манноза, D-галактоза, их соотношение 1:2:28; 1:14:23 в водорастворимых и 1:2 (манноза:глюкоза); 1:2:8 в солевых фракциях. Основная фракция внутриклеточного полисахарида *S. schevczenkovi* – гомоглюкан. Экзопполисахариды *G. lucidum* и *L. edodes* – гетерогликаны, в которых глюкоза составляет 93-98%, *S. schevczenkovi* – гомо- и гетерогликаны, состоящие из D-глюкозы и D-галактозы. Экзо- и эндополисахариды – разветвленные гликаны, содержащие α - и β -гликозидные связи. Основная цепь представлена глюканами с C1→C3, боковые – гликанами с C1→C4 и C1→C6-гликозидными связями. Показано, что внеклеточные и внутриклеточные полисахариды глубинного мицелия исследованных видов грибов по соотношению моно-меров, их конфигурации и молекулярной структуре аналогичны полисахаридам плодовых тел.

Установлено, что глубинная биомасса ксилотрофных базидиомицетов способна связывать значительное количество ионов тяжелых металлов и характеризуется высокой селективностью по отношению к особенно опасным поллютантам – свинцу и кадмию. Мицелий ксилотрофов имеет высокоразвитую микропористую структуру и обладает свойствами полиамфолитов с высокой способностью связывать экзо- и эндотоксины анионной природы.

Выявлено, что сорбционная способность клеточных стенок грибов и нативного мицелия по отношению к ионам тяжелых металлов и эндотоксикантам в значительной степени зависит от способа культивирования. Более высокую сорбционную активность по отношению к ионам меди имеют клеточные стенки, выделенные из поверхностного мицелия. При связывании ионов свинца и кадмия наблюдается, как правило, обратная закономерность – эти элементы более активно связывают клеточные стенки глубинного мицелия. Удаление из грибной клеточной стенки биополимеров матрикса (белки, щелочерастворимые гетерогликаны) повышает доступность активных центров хитин-глюканового комплекса для связывания ионов металлов.

Доказано, что сорбционную способность биомассы грибов можно регулировать условиями культивирования. В опытах *in vitro* установлено, что мицелий, клеточные стенки и хитин-глюкановый комплекс грибов обладают радиопротекторными свойствами и способностью выводить из организма токсины эндогенного происхождения. Сорбционная ёмкость биомассы *G. lucidum* по отношению к ионам стронция в 5 раз выше, чем у коммерческого энтеросорбента «Полифепан».

Сорбционная активность структурных биополимеров клеточных стенок грибов зависит от их влажности и условий высушивания, концентрации сорбата, кислотности среды. Оптимальные условия для связывания тяжелых металлов обеспечивает кислотность среды в области pH, близкой 7, и низкотемпературная сушка до влажности не ниже 60%. Ионы биогенных элементов не принимают участия в конкурентном взаимодействии с сайтами связывания ионов тяжелых металлов и не влияют на сорбционную емкость. Органические кислоты, аминокислоты и их производные, образующие с металлами хелатные комплексы, значительно ее снижают. Ионы тяжелых

металлов, являющихся микроэлементами (медь, цинк, железо), в низких концентрациях стимулируют рост грибов *P. ostreatus* и *G. lucidum* в глубинной культуре, а в высоких концентрациях – ингибируют. В зоне стимуляции наблюдается положительная корреляция между концентрацией ионов металлов в среде и их содержанием в грибной биомассе. Связанные металлы локализуются в основном в клеточной стенке и легко десорбируются 0,05 М раствором соляной кислоты.

Проведен скрининг видов высших базидиомицетов, синтезирующих липиды. Установлено, что наибольшей липидсинтезирующей способностью характеризуется штамм *L. sulphureus* БИМ F-361 Д, содержание липидов в мицелии которого достигает 26%. Наиболее высокое количество фосфолипидов отмечено в липидах видов родов *Ganoderma*, *Lentinus*, *Trametes*, *Laetiporus*. *Ganoderma lucidum* БИМ F-325 Д синтезирует не только уникальный комплекс липофильных соединений, но и значительное количество полисахаридов, *L. sulphureus* БИМ F-361 Д – 12-13 мг/г каротиноидов, что является основой использования их для создания новых функционально-корректирующих препаратов.

Подобраны оптимальные источники углеродного, азотного питания и их соотношения (17:1) для роста изученных видов грибов и синтеза ими липофильных соединений, что позволяет увеличить образование липидов на 18-25%, фосфолипидов – на 12-24%, линолевой кислоты – на 10-29%. На основании изучения физиологических потребностей грибов определена возможность замены в питательной среде дефицитных и дорогостоящих компонентов на вторичные продукты по переработке сельскохозяйственного сырья – молочную сыворотку, свекловичную мелассу, крахмал, а также продукты мукомольной и маслоперерабатывающей промышленности, которые составили основу промышленных сред.

Установлено, что изменение температуры, активной кислотности среды и аэрации позволяет регулировать биосинтез липидов и их состав. Температурный оптимум для активного роста *L. sulphureus* и *G. lucidum* и синтеза ими липидов отмечен при 26-28 °С. Изменение pH среды в пределах, обеспечивающих нормальный рост, не влияло на накопление липидов и степень их насыщенности. В условиях умеренной аэрации (скорость растворения кислорода 0,155-0,21 г O₂/л·ч) происходит макси-

мальное накопление биомассы с одновременно высоким выходом фармакологически ценных липидных метаболитов.

Показано, что в липидах глубинного мицелия *G. lucidum* и *L. sulphureus* нейтральные липиды составляют 62-73%, полярные – 27-38%. В составе нейтральных липидов количественно преобладают триацилглицерины, полярных – фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и кардиолипин. Установлена высокая антиоксидантная активность липидов исследуемых видов грибов, что связано с присутствием в них низко- и высокомолекулярных фенольных и липофильных соединений, в т. ч. пигментов, нейтральных липидов и фосфолипидов.

По физико-химическим свойствам и углеводному составу полисахариды исследованных видов грибов близки β -(1 \rightarrow 3)-D-глюканам плодовых тел, составляющим основу ряда лекарственных средств иммуностимулирующего и онкостатического действия (кориолан, шизофиллан), что открывает перспективу использования полисахаридов глубинного мицелия и культурального фильтрата, а также биомассы грибов для получения лечебно-профилактических препаратов, в т.ч. с сорбционными свойствами. Учитывая значимость ряда биологически активных соединений (в т.ч. эссенциальных полиеновых жирных кислот, фосфолипидов, провитаминных соединений, а также полисахаридов, каротиноидов, меланинов) в жизнедеятельности организма человека и животных, возможно создание комплексных препаратов широкого спектра действия с функционально-корректирующими свойствами на основе биомассы глубинного мицелия как отдельных грибов-продуцентов, так и специально составленных композиций из них, взаимодополняющих и усиливающих действие друг друга.

Список литературы

- Бабицкая В.Г.** Меланиновые пигменты грибов *Paecilomyces variotii* и *Aspergillus carbonarius* // Прикл. биохим. и микробиол. – 2000. – **36**, № 2. – С. 153-159.
- Бабицкая В.Г.** Физиологически активные соединения и биологическое действие глубинного мицелия ксилотрофного базидиомицета *Ganoderma lucidum* // Биотехнология. – 2003. – № 4. – С. 35-44.
- Бабицкая В.Г., Щерба В.В.** Вещества фенольной природы некоторых базидиомицетов // Микробиология. – 1999. – **68**, № 1. – С. 70-73.

- Бабицкая В.Г., Щерба В.В.** Природа меланиновых пигментов некоторых микро- и макромицетов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2002. – **38**, № 3. – С. 286-291.
- Бабицкая В.Г., Малама А.А., Филимонова Т.В.** Характеристика меланинового комплекса, образуемого грибом *Alternaria alternata* (Fries) Keissler // Там же. – 1998а. – **34**, № 4. – С. 426-429.
- Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Иконникова Н.В.** Меланиновый комплекс гриба *Inonotus obliquus* // Там же – 2000. – **36**, № 4. – С. 439-444.
- Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Осадчая О.В.** Антиокислительная активность некоторых микро- и макромицетов – деструкторов лигно-целлюлозных субстратов // Там же. – 1997. – **33**, № 5. – С. 559-563.
- Бабицкая В.Г., Малама А.А., Филимонова Т.В., Щерба В.В.** Сравнительная характеристика меланинового комплекса, образуемого *Phellinus robustus* и *Alternaria alternata* // Микол. и фитопат. – 1998б. – **32**, № 4. – С. 25-29.
- Бабицкая В.Г., Пленина Л.В., Пучкова Т.А., Рожкова З.А.** Биологическая активность глубинной биомассы лекарственного гриба *Lentinus edodes* // Физиология и биохимия культивируемых грибов: Мат. междунар. науч. конф., Саратов, 6-8 июня 2002 г. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2002а. – С. 30-31.
- Бабицкая В.Г., Пучкова Т.А., Щерба В.В., Осадчая О.В.** Ксилотрофный базидиомицет *Pleurotus ostreatus* – продуцент биологически активных веществ // Вестн. Фонда фонд. исслед. – 2005. – № 4. – С. 40-49.
- Бабицкая В.Г., Пучкова Т. А., Щерба В.В. Рожкова З.А. Осадчая О.В., Филимонова Т.В.** Фенольные соединения гриба *Lentinus edodes* // Микробиология и биотехнология XXI ст.: Мат. Междунар. конф., Минск, 22-24 мая 2002 г. – Минск, 2002б. – С. 164-165.
- Бадалян С.М., Гаспарян А.В, Гарибян Н.Г.** Исследование антиоксидантной активности некоторых базидиальных макромицетов // Микол. и фитопат. – 2003. – **37**, вып. 5. – С. 63-68.
- Бандюкова В.А., Лигай Л.В.** Перспективы использования полисахаридов в медицине и фармации: Обзор. информ. – М., 1997. – Вып. 6. – С. 1-19.
- Барабой В.А.** Структура, биосинтез меланинов, их биологическая роль и перспективы применения // Усп. соврем. биол. – 2001. – **121**, № 1. – С. 36-46.
- Беллами Л.** Новые данные по инфракрасным спектрам сложных молекул. – М.: Мир, 1971. – 318 с.

- Беспалова Л.А.** Особенности липогенеза базидиомицетов *Pleurotus ostreatus* и *Flammulina velutipes* при культивировании на различных средах // Прикл. биохим. и микробиол. – 2002. – **38**, № 4. – С. 405-412.
- Бисько Н.А., Ровбель Н.М., Гончарова И.А.** Биосорбция тяжёлых металлов мицелием высших базидиальных грибов // Укр. бот. журн. – 2004. – **61**, № 6. – С. 52-56.
- Борисюк Л.Г., Харатьян Е.Ф., Жданова Н.Н.** Локализация и динамика накопления меланина в клетках *Cladosporium cladosporioides* // Микробиол. журн. – 1991. – **53**, № 6. – С. 10-6.
- Борщевская М.И., Васильева С.М.** Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопр. мед. хим. – 1999. – **45**, № 1. – С. 13-23.
- Бробст К.М., Свилей К.К., Таои Р.В.П. и др.** Методы исследования углеводов. – М.: Мир, 1975. – 445 с.
- Бурлакова, Е.Б., Храпова Н.Г.** Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Усп. хим. – 1985. – **54**, вып. 2. – С. 1540-1558.
- Бухало А.С.** Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.
- Бухало А.С., Соломко Э.Ф., Митропольска Н.Ю.** Базидіальні макромицети з лікарськими властивостями // Укр. бот. журн. – 1996. – **53**, № 3. – С. 192-203.
- Васьковский В.Е.** Липиды // Сорос. образов. журн. – 1997. – № 3. – С. 32-37.
- Вербич С.В., Гребенюк В.Д., Сорокин Г.В.** Сорбция ионов меди и никеля из разбавленных растворов ионитом АНКБ-35 // Хим. технол. воды. – 1994. – **16**, № 2. – С. 186-190.
- Верещагин А.Г., Скворцов С.В., Исаков Н.И.** Состав триглицеридов масла хлопчатника // Биохимия. – 1963. – **28**, № 5. – С. 868-878.
- Власова Е.Г.** Аналитическая химия: Химические методы анализа: Учеб. пособ. – М.: Химия, 1993. – 396 с.
- Гальперин Ю.М., Лазарев П.И.** Пищеварение и гомеостаз. – М.: Наука, 1986. – 304 с.
- Гарибова Л.В., Антимоновна А.В., Завьялова Л.А., Краснополяская Л.М.** Рост и морфологические признаки мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* в зависимости от условий культивирования // Микол. и фитопат. – 2003. – **37**, вып. 3. – С. 14-19.

- Гвоздкова Т.С., Черноок Т.В., Капич А.Н.** АОА липидов грибов различных таксономических групп // Весці НАН Беларусі. – 2000. – № 4. – С. 50-53.
- Гвоздкова Т.С., Черноок Т.В., Капич А.Н., Бабицкая В.Г., Пленина Л.В.** Серно-желтый трутовик – перспективный объект биотехнологии // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Мат. Междунар. конф., Минск-Раков, 1-2 июня 2006 г. – Мн.: НоваПринт, 2006. – С. 232-235.
- Гесслер Н.Н., Рудченко М.Н., Белозерская Т.А.** Изменение активности компонентов антиоксидантной защиты под действием стрессорных факторов у *Neurospora crassa* дикого типа и мутантов по фоторецепторному комплексу // Микробиология. – 2008. – 77, № 2. – С. 163-170.
- Гончарова И.А., Ровбель Н.М.** Сорбционные свойства мицелия базидиомицета *Phellinus robustus* // Проблемы современной микробиологии и биотехнологии: Тез. докл. науч. конф., 27-29 окт. 1999 г. / АН Узбекистана. Ин-т микробиол. – Ташкент, 1999. – С. 131.
- Гончарова И.А., Щерба В.В., Бабицкая В.Г.** Полисахариды клеточной стенки базидиомицета *Coriolus hirsutus* // Прикл. биохим. и микробиол. – 1996. – 32, № 4. – С. 434-437.
- Горбунова Е.А., Терехова В.А.** Тяжелые металлы как фактор стресса для грибов: проявление их действия на клеточном и организменном уровнях // Микол. и фитопат. – 1995. – 29, № 4. – С. 63-69.
- Горовой Л.Ф.** Радиопротекторные свойства нового препарата «Микотон» // Мед. радиол. и радиац. безопасн. – 1999. – № 4. – С. 47-52.
- Горовой Л.Ф.** Препарат «Микотон», полученный из высших базидиальных грибов // Усп. мед. микол. Т. 1. – М.: Нац. акад. микол., 2003. – С. 271-273.
- Горовой Л.Ф., Косяков В.Н.** Клеточная стенка грибов – оптимальная структура для биосорбции // Биополимеры и клетка. – 1996. – 12, № 4. – С. 49-60.
- Горшина Е.С.** Грибы рода *Trametes* Fr. как объекты биотехнологии // Усп. мед. микол. Т. 9. – М.: Нац. акад. микол., 2008. – С. 328-329.
- Горшина Е.С., Скворцова М.М.** Трамелан – отечественная биологически активная добавка на основе сухой биомассы лекарственного базидиомицета *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilt и другие препараты грибов рода *Trametes* // Усп. мед. микол. Т. 5. – М.: Нац. акад. микол., 2005. – С. 262-266.
- Горшина Е.С., Исаакян Л.А., Качалай Д.А., Макарова М.А., Скворцова М.М.** Препарат, влияющий на тканевый обмен и моду-

- лирующий процессы иммунитета в биологических системах, и биологически активная пищевая добавка «МИПРО-ВИТ» / Пат. 2092179 С1 Россия, МКИ 6 А 61 К 35/84, А 23 L 1/054. – № 96123264/13; Заявл. 15.12.96; Оpubл. 10.10.97.
- ГОСТ 4453-74(88).** Уголь активированный осветляющий древесный порошкообразный. – М.: Госстандарт, 1989. – 24 с.
- Григораш А.И.** Способ получения биологически активной добавки к пище (варианты) / Пат. 223 54 81 Россия, МКИ 7 А 23 L 1/30. – Заявл. 10.09.2004.
- Грифитс Э.** Методы практической биохимии. – М.: Мир, 1978. – 268 с.
- Грушенко М.М., Аникиенко Т.С., Резников В.М.** Совместное использование фенол-серноокислотного и толуидинового способов определения сахаров как метод изучения углеводного состава лигноуглеводного комплекса // Лигноуглеводные комплексы древесины. – Рига: Зинатне, 1978. – 70 с.
- Дудкин М.С., Щелкунов Л.Ф.** Пищевые волокна и новые продукты питания (Обзор) // Вопр. пит. – 1998. – № 2. – С. 35-41.
- Дудкин М.С., Щелкунов Л.Ф., Сагайдак Т.В., Данилова Е.И.** Пищевые волокна как энтеросорбенты экологически вредных веществ // Экология человека и проблемы воспитания молодых ученых: Междунар. конф. – Одесса: Астропринт, 1980. – С. 215-217.
- Евстигнеева Р.П.** Химия липидов. – М.: Химия, 1983. – 230 с.
- Егоров Н.С.** Практикум по микробиологии: Учеб. пособ. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 293 с.
- Елинов Н.П.** Химическая микробиология. – М.; Л.: Наука, 1989. – 448 с.
- Ермаков А.И.** Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 256 с.
- Ефименко О.М., Агеенкова Л.В.** О химическом составе плодового тела и искусственных культур трутового гриба *Fomitopsis officinalis* // Кормовые белки и физиологические вещества для животноводства. – М.; Л.: Наука, 1965. – С. 92-97.
- Жиры и масла животные.** Метод определения показателя преломления: ГОСТ Р 51445-99 (ИСО 6320-95). – Введ. 55.12.99; № 600. – М.: Стандартинформ, 2005. – 11 с.
- Закис Г.Ф.** Функциональный анализ лигнинов и их производных. – Рига: Зинатне, 1987. – 230 с.
- Запрометов М.Н.** Фенольные соединения. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
- Иванов А.В., Бакштейн М.С., Хасанова Е.М.** Сорбция ионов переходных металлов и свинца на карбоксиметил-целлюлозном

- сорбенте СМ-52 // Вестн. МГУ. Химия. – 2003. – **44**, № 6. – С. 412-416.
- Канарская З.А., Гамаюнова В.С., Шабрукова В.Е.** Влияние условий обработки биомассы мицелиального гриба *Aspergillus niger* на надмолекулярную структуру и адсорбционные свойства выделяемого хитин-глюканового комплекса // Биотехнология. – 2000. – № 3. – С. 63-66.
- Капич А.Н.** Антиокислительная активность экстрактов мицелия ксилотрофных базидиомицетов // Микол. и фитопатол. – 1995. – **29**, № 5. – С. 35-40.
- Капич А.Н., Шишкина А.Н.** Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов // Там же. – 1992. – **26**, вып. 6. – С. 486-493.
- Капич А.Н., Шишкина Л.Н.** Фосфолипиды мицелия дереворазрушающих базидиомицетов // Там же. – 1993. – **27**, № 3. – С. 32-37.
- Капич А.Н., Шишкина Л.Н.** Перекисное окисление липидов и его регуляция в мицелии ксилотрофных базидиомицетов // Микробиология. – 1995. – **64**, № 3. – С. 320-326.
- Капич А.Н., Гвоздкова Т.С., Сорока О.Н.** Способ получения кетокаротиноидов / Пат. 4914 С 1 ВУ, МКИ 7, С 12 Р 23/00, С12 Р 1/02. – № 1980458; Заяв. 12.05.1998; Опубл. 23.09.2002.
- Капич А.Н., Е.С. Романовец Е.С., Войт С.П.** О составе липидов мицелия *Flammulina velutipes* // Прикл. биохим. и микробиол. – 1989. – **25**, № 3. – С. 368-372.
- Капич А.Н., Романовец Е.С., Войт С.П.** Содержание и жирнокислотный состав липидов дереворазрушающих базидиомицетов // Микол. и фитопатол. – 1990. – **24**, № 1. – С. 51-56.
- Капич А.Н., Леонтьев Ю.Н., Конопля Е.Ф., Войт С.П.** Антиокислительная активность экстрактов мицелия настоящей губки // Вестні НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1991. – № 5. – С. 58-62.
- Карпушкина С.А.** Применение Microsoft Excel для статистического анализа данных медико-биологических исследований: учеб. пособие. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2001. – 152 с.
- Кваско Е.Ю., Бисько Н.А., Паршикова Т.В.** Антиоксидантная активность штаммов опенка зимнего *Flammulina velutipes* // Усп. мед. микол. Т. 2. – М.: Нац. акад. микол., 2008. – С. 129-130.
- Кейтс М.** Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
- Кирхнер Ю.** Тонкослойная хроматография. – М.: Мир, 1981. – Т. 1. – 616 с.
- Клебанов Г.И.** Антиоксидантные свойства производных 3-окси-пиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина // Вопр. мед. химии. – 2001. – № 3. – С. 12-15.

- Коронелли Т.В., Юферова С.Г., Удельникова Т.М., Комарова Т.И.** Связываюте ионов меди и стронция микромицетом *Mucor dimorphosporus* – деструктором жировых веществ // Прикл. биохим. и микробиол. – 1999. – **35**, № 3. – С. 342-344.
- Кручинский Н.Г., Петровский А.И., Василенко З.В.** Природные энтеросорбенты в лечебно-профилактическом питании // Рациональная политика здорового питания в Республике Беларусь: Мат. Междунар. конф. – Минск, 2001. – С. 82-85.
- Кукулянская Т.А.** Физико-химические свойства меланинов, образуемых чагой в природных условиях и при культивировании // Прикл. биохим. и микробиол. – 2002. – **38**, № 1. – С. 68-72.
- Кукулянская Т.А. Курченко В.П., Гавриленко Н.В., Курченко Н.В., Новиков Д.А., Сенюк О.Ф.** Генопротекторные свойства грибных меланинов // Усп. мед. микол. Т. 3. – М.: Нац. акад. микол., 2004. – С. 153-155.
- Курченко В.П.** Антиоксидантные и генопротекторные свойства природных меланиновых пигментов // Биохимия биологически активных соединений / Междунар. науч. конф., 16-18 нояб. 2005 г. – Минск, 2005. – С. 86-93.
- Курченко В.П., Кукулянская Т.А., Новиков Д.А. Горовой Л.Ф.** Биохимическая фармакология грибных меланинов // Усп. мед. микол. Т. 3. – М.: Нац. акад. микол., 2004. – С. 156-158.
- Курченко В.П., Сушинская, Н.В., Кукулянская Т.А., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф.** Механизм сорбции тяжелых металлов грибными меланинами // Усп. мед. микол. Т. 5. – М.: Нац. акад. микол., 2005. – С. 153-155.
- Ленинджер А.** Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – Т. 1-3.
- Лях С.П.** Микробный меланиногенез и его функции. – М.: Наука, 1981. – 273 с.
- Макордей Ф.В.** Алломеланины. Методы получения, физико-химические свойства, возможности практического использования // Хим. и хим. технол. – 1994. – **37**. – С. 4-6.
- Методы** исследования природных флавоноидов / Под ред. А.Л. Шинкаренко. – Пятигорск: Минздрав РСФСР, 1977. – 69 с.
- Милевич Т.И., Конопля Е.Ф.** Сорбционные свойства биомассы базидиального гриба вешенка по отношению к ионам тяжелых металлов и радионуклидов// Коллоид-2003: Тез. докл 11 Междунар. конф. – Минск: Изд-во БГУ, 2003. – С. 130.

- Михайлова Н.В.** Липиды высших грибов и их жирнокислотный состав при различных экологических условиях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Днепропетровск, 1990. – 16 с.
- Михайлова Н.В.** Изменения в составе липидов в процессе дифференцировки грибов порядка *Agaricales* // Прикл. биохим. и микробиол. – 1993. – **39**, № 2. – С. 315-319.
- Мысякина И.С., Фунтикова Н.С.** Липиды спорангиоспор мицелиального гриба *Mucor ramannianus*, неспособного к диморфному росту // Микробиология. – 2007. – **76**, № 2. – С. 179-183.
- Низковская О.П.** Рост высших грибов в глубинной культуре // Микол. и фитопат. – 1972. – **6**, № 4. – С. 306-312.
- Панина Л.К.** Спектры ЭПР темноокрашенных микромицетов, изолированных из мрамора // Там же. – 1997. – **1**, № 1. – С. 46-51.
- Паронян В.Х.** Растительные масла // Хим. энцикл. http://www.chemport.ru/chemical_encyclopedia_article_3232.html.
- Петербургский А.В.** Практикум по агрономической химии. – М.: Колос, 1968. – 496 с.
- Проскуряков Н.И., Попова Е.М., Осипов Ф.М.** К содержанию эргостерина в различных дрожжах // Биохимия. – 1938. – **3**, № 3. – С. 397-405.
- Пучкова Т.А., Рожкова З.А., Бабицкая В.Г.** Влияние условий культивирования на рост гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing в глубинной культуре и образование экзополисахаридов // Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология / Мат. Междунар. симп., Москва, 18-21 нояб.; Минск, 22-24 нояб. 2001 г. – Минск, 2001. – С. 408-409.
- Пучкова Т.А., Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Анисимова Н.И., Навоша Ю.В., Пармов С.В.** Полисахариды глубинного мицелия гриба *Lentinus edodes* // Микробиология и биотехнология XXI ст. / Мат. Междунар. конф., Минск, 22-24 мая 2002 г. – Минск, 2002а. – С. 191-192.
- Пучкова Т.А., Щерба В.В., Рожкова З.А., Осадчая О.В., Филимонова Т.В., Орлова Л.А., Михеева Л.Д.** Культивирование *Lentinus edodes* в лабораторных ферментерах // Микробиология и биотехнология XXI ст.: Мат. Междунар. конф., Минск, 22-24 мая 2002 г. – Минск, 2002б. – С. 262-264.
- Ровбель Н.М.** Сорбционный потенциал глубинной биомассы высших базидиомицетов // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2004. – № 4. – С. 70-73.

- Ровбель Н.М., Гончарова И.А.** Связывание ионов тяжелых металлов хитином и хитин-глюкановым комплексом высших базидиомицетов // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2004. – № 2. – С. 97.
- Ровбель Н.М., Гончарова И.А.** Предпочтительность сорбции ионов тяжелых металлов биомассой базидиальных грибов // Усп. мед. микол. Т. 5. – М.: Нац. акад. микол., 2005. – С. 221-223.
- Ровбель Н.М., Соколова Н.Е., Пехтерева В.С.** Роль компонентов клеточной стенки базидиомицетов в связывании ионов тяжёлых металлов // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Мат. Междунар. конф., Минск, 26-28 мая 2004 г. – Минск: НоваПринт, 2004. – С. 262-264.
- Руководство** по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище Р 4.1.1672-03. – Москва, 2003. – 17 с.
- Сборник** методик выполнения измерений, допущенных к применению в деятельности лабораторий экологического контроля. – Минск, 1997. – С. 145-147.
- Соколова Т.В., Ровбель Н.М., Гончарова И.А., Пехтерева В.С.** Сорбция стронция, свинца и кадмия мицелием дереворазрушающих грибов // Природопользование. – 2005. – Вып. 11. – С. 174-176.
- Соловьева Н.Л.** О липидах *Phytium deboryanum* // Микробиология. – 1997. – **66**, № 4. – С. 475-480.
- Спирин А.С.** Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – № 5. – С. 656-662.
- Степаненко Б.Н.** Химия и биохимия углеводов (полисахариды). – М.: Высш. шк. – 1978. – 256 с.
- Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И.** Физиологически активные липиды. – М.: Наука, 1991. – 136 с.
- Сухаревич В.И.** Рост микромицетов и синтез пигментов на средах, содержащих фунгициды и ингибиторы пигментообразования // Микол. и фотопатол. – 2000. – **42**, № 3. – С. 43-47.
- Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.В.** Получение и использование в медицине меланинов из трутовых грибов // Успехи медицинской микологии. Т. 7. – М.: Нац. акад. микол., 2006. – С. 255-259.
- Сушинская Н.В., Курченко В.П., Шестак Л.М.** Применение термического анализа в изучении меланинов // Биохимия биологически активных соединений / Междунар. науч. конф., 16-18 нояб. 2005 г. – Минск, 2005. – С. 111-115.

- Сушинская Н.В., Кукулянская Т.А., Гавриленко Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сеник О.В.** Сорбция тяжелых металлов меланинами из некоторых базидиомицетов // Успехи медицинской микологии. Т. 3. – М.: Нац. акад. микол., 2004. – С. 192-194.
- Терешина В.М.** Состав мембранных липидов и протекторных углеводов мицелиального гриба *Aspergillus niger* при различных тепловых воздействиях // Успехи медицинской микологии. Т. 2. – М.: Нац. акад. микол., 2008. – С. 146-147.
- Терешина, В.М., Марьин А.П., Косяков В.Н.** Различная способность полисахаридов клеточной стенки *Aspergillus niger* к сорбции металлов // Прикл. микробиол. и биотехнол. – 1999. – **35**, № 4. – С. 432-436.
- Томсон А.Э., Соколова Т.В., Навоша Ю.Ю.** Оценка возможности использования торфа в качестве сорбента газообразного аммиака // Природопользование. – 2001. – Вып. 7 – С. 110-112.
- Томсон А.Э., Соколова Т.В., Соколова Н.Е.** Физико-химические и сорбционные свойства композиционных сорбционных материалов на основе торфа и минеральных составляющих // Там же. – 2004. – Вып. 10. – С. 131-141.
- Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И.** Биоорганическая химия. – М.: Медицина, 1991. – 462 с.
- Феофилова Е.П.** Изменения в липидном и углеводном составе клеток грибов в процессе онтогенеза и использование этих данных в хемотаксономии // Микол. и фитопат. – 1991. – **25**, вып. 4. – С. 348-359.
- Феофилова Е.П.** Липиды мицелиальных грибов и перспективы развития микробной леобиотехнологии. I. Липиды мицелиальных грибов // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. – 1990. – № 11. – С. 5-25.
- Феофилова Е.П.** Современные направления в изучении биологически активных веществ базидиальных грибов // Прикл. биохим. и микробиол. – 1998. – **34**, № 6. – С. 597-608.
- Феофилова Е.П., Бурлакова Е.Б., Кузнецова Л.С.** Значение реакции свободного окисления в регуляции роста и липидообразования эукариотных и прокариотных организмов // Там же. – 1987. – **23**, № 1. – С. 3-13.
- Феофилова Е.П., Марьин А.П., Терешина В.М.** Сорбция ионов свинца *Aspergillus niger*. Влияние предварительной обработки мицелия// Там же. – 1994. – **30**, № 1. – С. 149-155.
- Феофилова Е.П., Горнова И.Б., Меморская А.С., Гарибова Л.В.** Липидный состав плодовых тел и мицелия *Lentinus edodes* (Berk.)

- Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] // Микробиология. – 1998. – **67**, № 5. – С. 655-659.
- Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Терешина В.М., Козлов В.П.** Полиаминсахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования (Обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. – 1996. – **32**, № 5. – С. 483-492.
- Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. и др.** Изменения в составе углеводов цитозоля в процессе цитодифференцировки грибов порядка *Agaricales* // Микробиология. – 1999. – **68**, № 3. – С. 356-361
- Хайс И. М., Мацек К.** Хроматография на бумаге. – М.: Иностран. лит., 1962. – 333 с.
- Хорлин А.Я.** Методы исследования углеводов. – М.: Мир, 1975. – 445 с.
- Щерба В.В.** Грибные метаболиты – основа функциональных препаратов нового поколения // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы / Междунар. конф., Минск, 1-2 апр., 2005 г. – Минск, 2005. – С. 175-180.
- Щерба В.В., Бабицкая В.Г.** Образование внеклеточных полисахаридов некоторыми видами базидиомицетов // Прикл. биохим. и микробиол. – 1997. – **37**, № 4. – С. 419-423.
- Щерба В.В., Осадчая О.В., Трухоновец В.В.** Физиологически активные соединения грибов рода *Lentinus* // Проблемы микробиол. и биотехнол / Мат. между. конф. (Нац. акад. наук Респ. Беларусь. Ин-т микробиол.). – Минск, 1998. – С. 141-142.
- Щерба В.В., Сенчук В.В., Курченко В.П.** Меланиновые пигменты некоторых базидиомицетов // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1999. – № 2. – С. 49-53.
- Щерба В.В., Осадчая О.В., Рожкова З.А., Бабицкая В.Г., Пучкова Т.А.** Отбор грибов – продуцентов эндо- и экзополисахаридов // Микробиология и биотехнология XXI столетия: Мат. Между. конф., Минск, 22-24 мая 2002 г. – Минск, 2002. – С. 196-197.
- Шиврина А.Н.** Биологически активные вещества высших грибов. – М.;Л.: Наука, 1965. – 194 с.
- Шуваев В.А., Филатов Ю.И., Омелянчук П.А.** Определение фосфолипидов в новых видах сухой жировой смеси для производства ЗЦМ // Вестн. СевКавГТУ. Сер. Продовольствие. – 2004. – **7**, № 1. – С. 85-89.
- Юрлова Н.А., Копылова Г.В.** Оптимизация питательной среды для биосинтеза экзополисахарида *Aureobasidium pullulans* // Микол. и фитопатол. – 1993. – **27**, № 5. – С. 56-62.

- Ahrazem O., Leal J.A., Prieto A., Jimenes-Barbero J.** Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus verruculosus* and *A. ruber* // Carbohydr. Res. – 2001. – **336**. – P. 325-328.
- Albano E., Bellomo G., Benedetti A.** Alterations of hepatocyte Ca homeostasis by triethylated lead: are they correlated with cytotoxicity // Chem. Biol. Interact. – 1994. – **90**, N 1. – P. 59-72.
- Alison M.H.** Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors // Amer. J. Clinic. Nutr. – 2007 – **85**, N 5. – P. 1267-1274.
- Aloysius R., Karim M.I.A., Ariff A.B.** The mechanism of cadmium removal from aqueous solution by nonmetabolizing free and immobilized live biomass of *Rhizopus oligosporus* // World J. Microbiol. – 1999. – **15**, N 5. – P. 571-578.
- Ambrosi I., Lomonte C., Soleo L.** Nephropathy induced by heavy metals // Proc. 4th Bari Sem. in Nephrology. – Bary, Italy, 1990. – P. 85-100.
- Babitskaya V.G., Scherba V.V., Mitropolskaya N.Y., Bisko N.A.** Exopolysaccharides of Some Medicinal Mushrooms: Production and Composition // Intern. J. Med. Mushr. – 2000a. – **2**. – P. 49-52.
- Babitskaya V.G., Scherba V.V., Bisko N.A., Puchkova T.A., Mitropolskaya N.Y.** Some biologically active substances from Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus* (*Agaricomycetidae*) // Intern. J. Med. Mushr. – 2000b. – **3**. – P. 345-349.
- Babitskaya V.G., Puchkova T.A., Scherba V.V., Osadchaya O.V.** Biologically Active Substances of Mycelia and Fruiting Bodies of Mushrooms *Lentinus* Fr. and *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. // Ibid. – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 106.
- Babitskaya V.G., Scherba V.V., Ikonnikova N.V., Bisko N.A.** Melanin complex from *Inonotus obliquus* (*Aphyllphoromycetidae*) // Ibid. – 2002. – **4**, N 2. – P. 139-146.
- Babitskaya V.G., Bisko N.A., Scherba V.V., Mitropolskaya N.Y.** Some biologically active substances from Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.)P. Karst. (*Aphyllphoromycetidae*) // Ibid. – 2003. – **5**, N 3. – P. 301-305.
- Babitskaya V.G., Bisko N.A., Scherba V.V., Puchkova T.A., Mitropolskaya N.Y.** Some physiological aspects of the submerged cultivation of culinary-medicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (*Agaricomycetidae*) // Ibid. – 2004. – **6**, N 4. – P. 345-349.
- Babitskaya V.G., Bisko N.A., Scherba V.V., Mitropolskaya N.Y.** Study of melanin complex from Medicinal Mushroom *Phellinus robustus* (*Aphyllphoromycetidae*) // Ibid. – 2007. – **9**. – P. 177-184.

- Berovic M., Habijanac J., Zore I.** Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides // J. Biotechnol. – 2003. – **103**, N 1. – P. 77-86.
- Bradford M.M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**, N 1/2. – P. 248-254.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Phander M.** Isolation and analysis // Carotenoids. – Vol. 1A., Ch. 5. – Basel: Birkhauser, 1995. – P. 81-108.
- Bruguerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M.** An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization // Polymer. – 2001. – **42**. – P. 3569-3580.
- Burdukova L.I., Gorovoj L.F.** Fungal chitin in medicine: prospects for its application // Intern. J. Med. Mushr. – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 126-127.
- Butler M.J., Day A.W.** Fungal melanins: a review // Can. J. Microbiol. – 1998. – **44**. – P. 1115-1136.
- Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y.** Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* // Canc. Res. – 1970. – **30**. – P. 2776-2781.
- Chodak M.** Content of Pb, Cd, Zn, Cu in soils and selected species of forest region in the Northern Sweden – Southern Poland Transect // 5th Intern. Symp. and Exhibition on environmental contamination in central and eastern Europe. – Prague, 2000. – P. 152.
- Coban T., Beduke Y., Iscan M.** In vitro effect of cadmium and nickel on glutation, lipid peroxidation and glutation-S-transferase in human kidneys // Toxicol. in vitro. – 1996. – **10**. – P. 241-245.
- Davoli P.** Laetiporic acids – a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit bodies and liquid cultures of *Laetiporus sulfureus* // Phytochem. – 2005. – **66**. – P. 817-823.
- De Angelis F.** Partial structures of truffle melanins // Ibid. – 1996. – **43**. – N 5. – P. 1103-1106.
- Di Lena G., De Annibale A., Sermanii G.G.** Influence of the age and growth conditions on the mycelial chitin content of *Lentinus edodes* // J. Basic Microbiol. – 1994. – **34**, N 1. – P. 241-245.
- Elisashvili V., Kachishlishvili N., Tsiclauri N. et al.** Physiological regulation of edible and medicinal higher Basidiomycetes lignocellulolytic enzyme activity // Intern. J. Med. Mushr. 2002. – **4**, N 2. – P. 159-166.
- Enochs W.S., Nilges V.J., Swartz H.M.** A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron

- paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy // *Pigment Cell Res.* – 1993. – **6**, N 2. – P. 91-99.
- Fan L., Soccol A.T., Pandey A.** Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser LPB 03 (*Agaricomycetidae*) in submerged fermentation and its antitumor effect // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2003. – **5**, N 1. – P. 19-27.
- Fang Q.H., Zhong J.J.** Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* // *Proc. Biochem.* – 2002. – **37**. – P. 769-774.
- Fogarty R.V., Tobin J.M.** Fungal melanins and their interaction with metals // *Enzyme and Microbiol Technol.* – 1996. – **19**, N 4. – P. 311-317.
- Folch I., Lees M., Sloan-Staulet G.H.S.** A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* – 1957. – **226**, N 1. – P. 491-509.
- Fowler B.A.** Mechanisms of kidney cell injury from metals // *Environ. Health Persp.* – 1992. – **100**. – P. 56-63.
- Gadd G.M.** Interaction of fungi with toxic metals // *New Phytol.* – 1993. – **124**. – P. 25-60.
- Gadd G.M., Rome L.** Biosorption of copper by fungal melanin // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1988. – **29**, N 6. – P. 610-617.
- Goncharova I.A., Babitskaya V.G.** Melanin pigments of medicinal mushrooms // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 148.
- Gromov S., Paramonov S.** Problems of evaluating atmospheric heavy metal balances for the former USSR // 5th Intern. Symp. and exhibition on environmental contamination in Central and Eastern Europe. – Prague, 2000. – P. 108.
- Gu Y., Kaida T., Kaida K.** Immunostimulating and Antitumor Effect by *Inonotus obliquus* // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2005. – **7**, N 3. – P. 406.
- Gutierrez A., Prieto A., Martinez A.T.** Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus* // *Carbohydr. Res.* – 1996. – **281**. – P. 143-154.
- Halliwell B., Carroll E.C.** Oxygen-derived species: the relation to human disease and environmental stress // *Environ. Health Persp.* – 1994. – **102**, N 10. – P. 5-12.
- Harvey L., Mc Neil B., Kristiansen B.** Production of Lentinan by submerged cultivation of *Lentinus edodes* // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2001. – **3**. – P. 161.

- Henson J.M. , Butler M.J., Day A.W.** The dark side of the mycelium: Melanins of phytopatogenic fungi // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 1999. – **34.** – P. 447-471.
- Hwang H.J., Kim S.W., Xu C.P. et al.** Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus* // *J. Appl. Microbiol.* – 2003. – **94.** – P. 708-719.
- Ito S.A.** Chemists view of melanogenesis // *Pigment Cell Res.* – 2003. – **16.** – P. 230-236.
- Ito S., Wakamatsu K., Ozeki H.** Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis // *Ibid.* – 2000. – **13** (Suppl. 8). – P. 103-109.
- Jacobson E.S., Tinner S.B.** Antioxidant function of fungal melanin // *J. Bacteriol.* – 1993. – **175**, N 21. – P. 7102-7104.
- Kakareka S.V., Homich V.S.** Anomalies of heavy metals in soils of urban landscape // *Urban ecology.* – Berlin: Springer, 1998. – P. 165-167.
- Kessler A., Brand M.D.** Localization of the sites of action of cadmium on oxydative phosphorylation in potato tuber mitochondria using top-down elasticity analysis // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – **225.** – P. 897-906.
- Kim S.W., Hwang H.J., Park J.P.** Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2002. – **34.** – P. 56-61.
- Lonwerys R.R., Bernard A.M., Roels H.A.** Cadmium: exposure markers as predictors of nephrotoxic effects // *Clin. Chem.* – 1994. – **40**, N 2. – P. 1391-1394.
- Losel D.M.** *Microbial lipids.* – London: Acad. Press, 1988. – Vol. 1. – 699 p.
- Lowry O.M., Kosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – N 193. – P. 265-275.
- Luef E., Prey T., Kubinek C.P.** Biosorption of zink fungal mycelial wastes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1991. – **3**, N 5. – P. 688-692.
- Ma L.J., Rogers S.O., Catranis C.M.** Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice // *Mycologia.* – 2000. – **92.** – P. 286-295.
- Manzoni M., Rollini M.** Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Daedalea quercina* // *Biotechnol. Lett.* – 2001. – **23.** – P. 1491-1497.
- Mateo M.C., Aragon P., Prieto M.P.** Inhibitory effect of cysteine and methionine on free radicals induced by mercury in red blood cells of

- patients undergoing haemodialysis // *Toxicol. in vitro.* – 1994. – **8**, N 4. – P. 597.
- Mironenko N.V.** Intraspecific variation in gamma-radiation resistance and genomic structure in the filamentous fungus *Alternaria alternata*: a case study of strains inhabiting Chernobyl reactor // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2000. – **45**. – P. 177-187.
- Nagyova A., Galbavy S., Ginter E.** Histopatological evidence of vitamin C protection against Cd-nephroticity in guinea pigs // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 1994. – **46**, N 1. – P. 11-14.
- Nicolaus R.A.** Melanins. – Paris: Hermann Press, 1968. – P. 1-310.
- Nosanchuk J.D., Casadevall A.** The contribution of melanin to microbial pathogenesis // *Cell. Microbiol.* – 2003. – **5**. – P. 203-223.
- Nour el Dein M.S., Abdallah N.M.** Biosynthesis of fat in submerged culture of *Polyporus sulphureus* // *Zetsch. Allg. Mikrobiol.* – 1967. – **7**, N 1. – P. 29-32.
- Piatelli M.** The structure of melanins and melanogenesis – Ustilagomelanin // *Tetrahedron.* – 1965. – **21**, N 11. – P. 3229-3236.
- Prakasham R.S., Merrie J.S., Sheela R. et al.** Biosorption of chromium Y1 by free and immobilized *Rhizopus arrhizus* // *Environ. Pollut.* – 1999. – **104**, N 4. – P. 421-427.
- Prota G.** Melanins and melanogenesis. – New York: Acad. Press, 1992. – 290 p.
- Raize O., Argaman Y., Yannai S.** Mechanisms of biosorption of different heavy metals by brown marine macroalgae // *Biotechn. and Bioeng.* – 2004. – **87**, N 4. – P. 451-457.
- Ratray J.B., Wilkinson S.G.** Microbial lipids. – London: Acad. Press, 1988. – Vol. 1. – 555 p.
- Raw U., Gura E., Olzevski E., Wanger F.** Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing // *Ind. Microbiol.* – 1992. – **9**. – P. 12-26.
- Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K.** Higher basidiomycetes as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides (Review) // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2001. – **3**, N 4. – P. 361-394.
- Riley P.A.** Melanin // *Intern. J. Biochem. & Cell Biol.* – 1997. – **29**, N 11. – P. 1235-1239.
- Roberts L.M., Crawford R.J., Lonergan G.T.** Determination of optimal growth conditions and antibacterial activity of Australian *Ganoderma* species in liquid culture // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 211.

- Robinson C.H.** Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi // *New Phytologist*. – 2001. – **151**. – P. 341-353.
- Rovbel N.M., Goncharova I.A., Sokolova T.V.** Sorption of toxic metals by medicinal *Basidiomycetes* // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 213.
- Ryuichiro K., Kuniyoshi S., Ikuo S., Mototake T.** Estrogenic active substent derived from edible mushroom: Пат. 2004277414 Япония, МКИ 7 C 07 G 17/00, A 23 L 1/28, A 23 L 1/30, A 61 P 5/30, A 61 P 19/02 / – № 0051066; заявл.26.02.2004; опубл. 07.10.2004.
- Sarcar S., Bhatnagar D., Poonam Y.** Cadmium-induced lipid peroxidation in rat livers slice: a possible involment of hydroxyl radicals // *Toxicol. in vitro*. – 1994. – **8**, N 6. – P. 1239-1242.
- Satoshi F., Kazuhiko H., Rumiko M., Jisaburo O.** Method for extracting lipid from mushroom, and food and cosmetic: Пат. 2004300438 Япония, МКИ7 C 11 B 1/10, A 23 D 9/007, A 23 L 1/212, A 61 K 7/00, A 61 P 3/02, A 61 P 35/00, A 61 P 37/04 / – № 0082344; заявл. 22.03.2004; опубл. 28.10.2004.
- Schaich K.M.** Metals and lipid oxidation. *Contemp. issues // Lipids*. – 1992. – **27**, N 3. – P. 209-218.
- Scherba V.V., Babitskaya V.G., Truchonovec V.V., Fomina V.I., Bisko N.A., Mitropolskaya N.Yu.** The influence of the cultivation conditions on the chemical composition of medicinal mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing // *Intern. J. Med. Mushr.* – 1999. – **1**. – P. 181-185.
- Schiewer S., Volesky B.** Modeling of the proton-metal ion exchange in biosorption // *Environ. Sci. Technol.* – 1995. – **29**. – P. 3049-3058.
- Senesi N.** Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry // *Adv. Soil Sci.* – 1990. – **14**. – P. 77-130.
- Siegel S.M.** Filamentous fungi as metal biosorbents: a review // *Water, Air and Soil Pollut.* – 1990. – **53**, N 3/4. – P. 335-344.
- Song C.H., Cho K.I., Nair N.G.** A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes* // *Mycologia*. – 1987. – **79**, N 6. – P. 866-876.
- Tang Y.J., Zhong J.J.** Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid // *Enzyme and Microbiol Technol.* – 2002a. – **31**. – P. 20-28.

- Tang Y.J., Zhong J.J.** Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum* grown on lactose in bioreactor // *Biotechnol. Lett.* – 2002b. – **24**. – P. 1023-1026.
- Tang Y.J., Zhong J.J.** Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and ganoderic acid // *Enzyme and Microbiol Technol.* – 2003. – **32**. – P. 478-484.
- Valadon L.R.G., Mummery R.S.** A new carotenoid from *Laetiporus sulfureus* // *Ann. Bot.* – 1969. – **33**. – P. 879-882.
- Vianna L.N.L., Andrade M.C., Jacques R.** Screening of waste biomass from *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus lentus* fermentation for removal of Cu, Zn and Cd by biosorption // *World J. Microbiol. and Biotechnol.* – 2000. – **1**, N 1. – P. 427-440.
- Wang H.X., Ng T.V., Liu W.K.** Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages // *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* – 1996. – **28**, N 5. – P. 601-607.
- Wang Y., Zhang M., Ruan D. et al.** Chemical components and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos* // *Carbohydr. Res.* – 2004. – **339**. – P. 327-334.
- Wasser S.P.** Medicinal mushrooms: past, present and future // *Укр. бот. журн.* – 2002. – **59**, N 5. – P. 499-524.
- Wasser S.P.** Medicinal mushroom science: history, current status, future trends and unsolved problems // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2010. – **12**, N 1. – P. 1-16.
- Wasser S.P., Weis A.L.** Medicinal mushrooms. *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Shiitake mushroom. – San Antonio, etc., 1997. – 95 p.
- Wasser S.P., Weis A.L.** Therapeutic effects of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushrooms: a modern perspective (Review) // *Crin. Rev. Immun.* – 1999. – **1**. – P. 65-96.
- Weet J.D.** Lipid biochemistry of fungi and other organisms. – New York: Plenum Press, 1980. – 388 p.
- Wheeler M.N.** Comparison of fungal melanin biosynthesis in ascomycetes, imperfect and basidiomycetes fungi // *Trans. Brit. Mycol. Soc.* – 1983. – **81**, N 1. – P. 29-36.
- Wheeler M.N., Bell A.A.** Melanins and their importance in pathogenic fungi // *Current topics in medical mycology.* – Berlin: Springer Verlag, 1987. – Vol. 2. – P. 338-387.

- Xin L., Xiaoni H., Zhqiang Z.** Process for extracting intracapsular lipid matter from *Ganoderma ectosporium*: Пат. 1302856 Китай, МКИ7 С 11 В 1/06/. – № 0130883; заяв. 25.12.2000а; опубл. 11.07.2001.
- Xin L., Xiaoni H., Zhqiang Z.** Process for extracting lipid matter of *Ganoderma* spore by immersing extraction: Пат.1302857 Китай, МКИ7 С 11 В 1/10/. – № 0130884; заяв. 25.12.2000b; опубл. 11.07.2001.
- Yalcinkaya Y., Soysal L., Denizli A. et al.** Biosorption of cadmium from aquatic systems by carboxymethylcellulose and immobilized *Trametes versicolor* // Hydrometallurgy. – 2002. – **63**, N 1. – P. 31-40.
- Yang B.K., Ha J.Y., Jeong S.C. et al.** Hypolipidemic effect of an exobiopolymer production from submerged mycelial culture of *Auricularia polytricha* in rats // Biotechnol. Lett. – 2002. – **24**. – P. 1319-1325.
- Yang F.C., Ke Y.F., Kuo S.S.** Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures // Enz. Microbial. Technol. – 2000. – **27**. – P. 295-301.
- Yokokawa H.** Fatty acid and sterol composition in mushrooms of ten species of *Polyporaceae* // Phytochemistry. – 1980. – **19**, N 12. – P. 2615-2618.
- Zhdanova N.N.** Fungi from Chernobyl // Mycol. Res. – 2000. – **104**. – P. 1421-1426.
- Zhong J.J., Fang Q.H., Tang Y.I.** Enhanced production of variable bioactive metabolites in submerged cultures of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* by manipulation of oxygen supply // J. Plant Biotechnol. – 2002. – **4**, N 3. – P. 109-115.

РОСТ КУЛЬТУР МАКРОМИЦЕТОВ НА АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ И ПЛОТНЫХ СУБСТРАТАХ

М.Л. Ломберг, Э.Ф. Соломко

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины

e-mail: margarita@lomberg.kiev.ua

Исследование роста наземных мицелиальных грибов в условиях искусственной культуры корректно проводить на плотных агаризованных средах, поскольку такой способ культивирования является достаточно приближенным к условиям роста этих грибов в природе (Кочкина и др., 1978; Великанов, Сидорова, 1983). Агаризованные питательные среды широко применяются для интродукции макромицетов в культуру, сохранения их в коллекциях и при проведении культуральных, морфологических и других экспериментальных исследований (Дудка и др., 1976; Билай, 1980; Методы ..., 1982; Бухало, 1988; Бухало и др., 2006). Агаризованные среды определенного состава используют также в производстве посевного мицелия съедобных и лекарственных грибов на этапе получения инокулюма или т.н. маточной культуры (Бисько и др., 1983; Бисько, Дудка, 1987; Chang, Hayes, 1978; Stamets, Chilton, 1983; Stamets, 1993, 2000).

С 1925 года, когда было установлено, что разрастание колоний гриба по поверхности субстрата происходит с постоянной скоростью, для изучения различных факторов, влияющих на рост грибов, стали использовать показатели скорости роста колоний. Последующие теоретические и экспериментальные исследования способствовали пониманию общих закономерностей кинетики роста различных гифальных организмов на плотных средах, созданию математических моделей, количественно характеризующих рост грибных колоний, и обнаружению определённых корреляций между параметрами роста грибов на поверхности агаризованных сред и ростом клубочков биомассы в глубинной культуре на жидких средах такого же состава (Перт, 1978; Панников, 1991; Allan,

Prosser, 1985; Reshetnikov et al., 1989; Gooday, 1995; Davidson et al., 1997). Результаты классических исследований А. Тринчи, проведенных в 70-х гг. XX ст. на микромицетах из различных систематических групп, показали следующее. Поскольку грибная гифа растёт удлиняясь в верхушке, рост колоний грибов всегда направлен радиально от центра (точки инокуляции) и путём измерения радиального разрастания колоний может быть установлена скорость роста организма в заданных конкретных условиях (Перт, 1978). При этом следует учитывать следующие общие закономерности кинетики роста грибных колоний. После инокуляции среды спорами или агаровыми блоками с вегетативным мицелием росту, как правило, предшествует лаг-фаза (рис. 1).

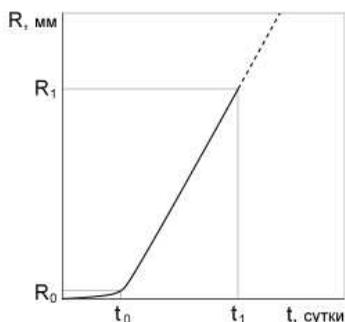


Рис. 1. Зависимость радиуса колонии (R) от времени культивирования (t)

Это период покоя разной продолжительности, который отражает время прорастания спор, время адаптации к новым условиям, активации ферментов, необходимых для роста и т.п. После этого следует короткий период экспоненциального увеличения радиуса колоний, а затем скорость радиального роста становится постоянной во времени. Установлено также, что если условия не изменились, скорость роста грибов по линейному закону остаётся постоянной неограниченное время. Скорость увеличения радиуса колоний (V_r) в период (t_1-t_0) , когда прирост длины мицелиальной гифы имеет постоянное значение, т.е. линейно зависит от времени культивирования, является тем

критерием, который объективно характеризует скорость роста организма в конкретных условиях культивирования. Скорость линейного роста зависит от вида и штамма гриба, связана с частотой ветвления гиф и другими ещё не вполне установленными особенностями организма (Перт, 1978). Радиальная скорость роста мицелия грибов в стадии линейной зависимости от времени культивирования является одним из главных количественных показателей, который характеризует тип жизненной стратегии организма и потенциальные возможности конкретных штаммов к освоению тех или иных естественных или искусственных субстратов (Великанов, Сидорова, 1983). Этот показатель позволяет количественно оценить влияние разных экологических факторов на рост грибов, сравнить скорость роста штаммов одного вида и определить отдельные оптимальные условия культивирования организма, поэтому является одним из важных критериев для скрининга штаммов, перспективных для дальнейшего практического использования в грибоводстве и биотехнологии (Chang, Miles, 1989, 2004; Chang, 1993).

Зависимость скорости роста вегетативного мицелия от состава агаризованных питательных сред была исследована ранее только у ограниченного числа штаммов и видов съедобных и лекарственных грибов, которые хранятся в Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ (ІВК) (Соломко и др., 2000; Solomko et al., 1998; Weis et al., 1999; Bilay et al., 2000). Поэтому представлялось важным обобщить результаты многолетних исследований разных видов и штаммов с использованием агаризованных питательных сред, применяемых в практике отечественных лабораторий, а также на коммерческих средах, используемых для культивирования отдельных видов съедобных и лекарственных грибов зарубежными исследователями.

В качестве посевного материала были использованы активно растущие 5-8-суточные культуры, выращенные на картофельно-глюкозном агаре (Методы ..., 1982). Диски мицелия диаметром 5 мм вырезали стерильной стальной трубкой на расстоянии 8-10 мм от края активно растущей колонии. Диски переносили и мицелием вниз помещали в центр чашки Петри диаметром 90 мм с различными агаризованными средами. Посевы инкубировали в термостате при температуре 26 °С, точно фиксируя

время начала роста (появление мицелия за пределами посевного диска). Радиусы колоний измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях через сутки, до полного обрастания среды. Для расчета средней скорости радиального роста (V_R , мм/сут) строили кривые зависимости радиуса мицелиальной колонии от времени культивирования, как показано на рис. 1, и в фазе линейной зависимости прироста радиуса от времени на основании 8-12 параллельных измерений определяли среднюю скорость роста (мм/сут) по формуле:

$$V_R = \frac{R_1 - R_0}{t_1 - t_0} ,$$

где R_1 – радиус колонии в конце роста, мм; R_0 – радиус колонии в начале фазы линейного роста, мм; $t_1 - t_0$ – продолжительность линейной фазы роста, сутки.

Экспериментально полученные кривые зависимости радиуса мицелиальных колоний (R) от времени культивирования на средах разного состава для культур двух видов базидиальных грибов представлены на рис. 2. Из них следует, что динамика роста колоний базидиальных грибов на агаризованных питательных средах может существенно отличаться рядом параметров. В редких случаях наблюдалось практическое отсутствие лаг-фазы (рост мицелия на опытной среде фиксировали уже через сутки после инокуляции) или ее наличие с разным сроком продолжительности, когда культура не растет (см. рис. 2). Время культивирования, необходимое для достижения колонией максимального размера ($R = 45$ мм), ограниченного объемом агаризованной среды в стандартных чашках Петри диаметром 90 мм, также может составлять 4, 6, 11, 14 или более суток. На основании результатов исследования динамики изменения радиуса колоний и анализа соответствующих кривых роста с целью точного определения времени начала линейной фазы роста нами проведены расчеты радиальной скорости роста мицелия 131 штаммов 49 видов макромицетов (табл. 1) на СА – агаризованном пивном сусле (8° бал), ПА – пшеничном агаре, ОА – овсяном и КГА – картофельно-глюкозном агаре, которые готовили общепринятыми методами (Методы ..., 1982).

Полученные нами данные значительно обогащают банк данных о культурах, которые хранятся в ИВК-коллекции, характеризуя их таким количественным физиологическим показателем, как скорость роста мицелия на ряде агаризованных сред, которые используются в отечественной практике. Эта информация, полученная при стандартных условиях культивирования, дает представление о достаточно большом разнообразии физиологических свойств культур отдельных видов и штаммов в пределах одного вида, что, в свою очередь, может быть использовано для отбора штаммов определенного вида и исследований внутривидового биоразнообразия по другим физиологическим признакам, а также рассмотрена в разных аспектах.

Если применить к высшим базидиомицетам общепринятые критерии, которые используются при рассмотрении жизненных стратегий мицелиальных грибов (Великанов, Сидорова, 1983), то к быстрорастущим r-стратегам, радиальная скорость роста которых равняется или превышает 0,5 мм/ч (или $V_R > 12$ мм/сут), можно отнести *G. lucidum* 1621, *P. djamor* 1526 и *V. volvaceae* 1605. Очень близкими к этой группе являются отдельные штаммы вида *P. ostreatus* (133, 530, 1017), скорость роста которых превышает 11 мм/сут. К C-стратегам, радиальная скорость роста которых ниже 0,05 мм/ч (т.е. $V_R < 1,2$ мм/сут), принадлежат, по видимому, культуры *Psilocybe cyanescens*, а также отдельные представители рода *Marasmius* (*M. alliaceus* 77, 247 и *M. androsaceus* 136). Но подавляющее большинство, а именно около 92% исследованных культур, по показателю скорости роста занимают промежуточное положение и, исходя из этого критерия, скорее всего принадлежат к группе организмов, которые реализуют P-тип жизненной стратегии.

Из литературы известны попытки использования отдельных физиологических свойств и, в частности, скорости роста мицелия в таксономии высших базидиомицетов на вегетативной стадии развития (Li, Chen, 1984).

Данных для практического использования таких подходов пока недостаточно, однако среди исследованных нами культур можно отметить определенные закономерные отличия в скорости роста культур, которые принадлежат к разным видам.

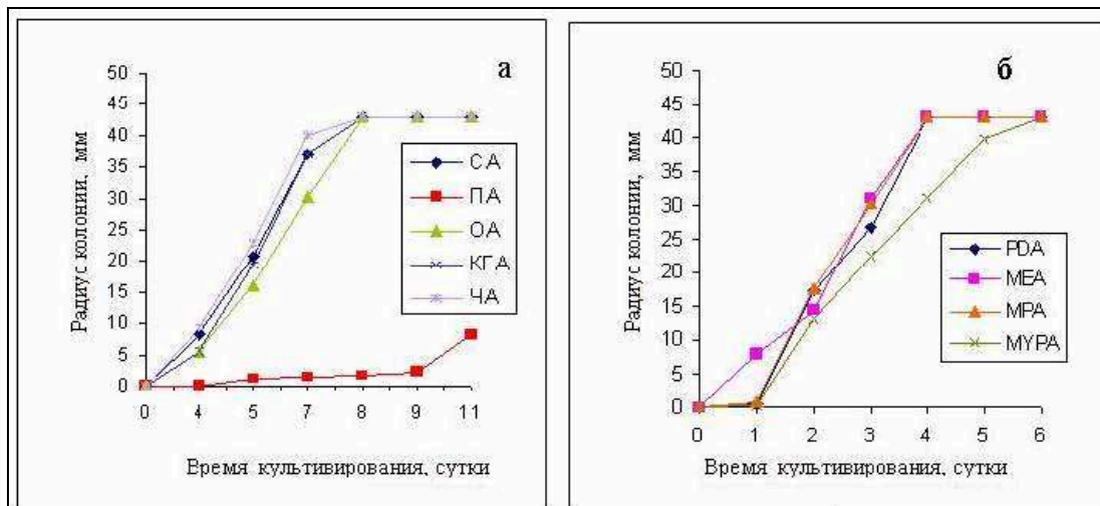


Рис. 2. Динамика увеличения радиуса колоний *Piptoporus betulinus* 1653 (а) и *Schizophyllum commune* 96 (б) на разных агаризованных средах: СА – сусло-агар, ПА – пшеничный агар, ОА – овсяный, КГА – картофельно-глюкозный агар; ЧА – среда Чапека, PDA – картофельно-декстрозный агар («Oxoid», Англия), MEA – мальт-экстракт агар («Oxoid», Англия), MPA – мальт-экстракт-пептонный агар («Merck», Германия), MYPA – мальт-экстракт-дрожжевой-пептонный агар («Merck», Германия)

Таблица 1. Скорость радиального роста мицелия высших базидиальных грибов на агаризованных питательных средах при 26 °С (V_r , мм/сут)

N п/п	Вид	Штамм IBK	СА рН 6,0±0,3	ПА рН 5,7±0,3	ОА рН 6,2±0,0	КГА рН 6,5±0,2
1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Agrocybe aegerita</i>	12	3,3±0,4	5,3±0,2	-	4,3±0,3
2	- " -	167	4,8±0,1	6,0±0,0	6,4±0,3	4,3±0,0
3	- " -	168	3,1±0,1	5,8±0,2	4,9±0,0	4,5±0,3
4		217	1,9±0,1	3,2±0,1	1,6±0,4	2,3±0,1
5	- " -	948	3,8±0,1	5,6±0,3	5,5±0,3	4,5±0,1
6	- " -	960	5,3±0,0	5,2±0,3	5,3±0,1	4,6±0,1
7	- " -	1503	2,8±0,0	4,5±0,3	4,5±0,2	3,9±0,2
8	<i>Auricularia auricular-judae</i>	961	3,5±0,0	5,5±0,5	0,9±0,2	5,1±0,1
9	<i>A. polytricha</i>	517	5,5±0,1	5,9±0,5	6,4±0,2	6,4±0,3
10	- " -	975	5,3±0,3	7,0±0,0	4,7±0,5	7,4±0,4
11	<i>Coprinus cinereus</i>	199	2,2±0,2	4,9±0,1	7,1±0,7	2,5±0,4
12	<i>C. comatus</i>	137	2,4±0,0	5,3±0,4	5,5±0,5	4,4±0,5
13	- " -	138	3,4±0,2	4,9±0,3	3,5±0,2	3,1±0,5
14	- " -	173	3,5±0,2	4,9±0,1	5,7±0,2	8,3±0,1
15	<i>Daedalea quercina</i>	350	3,4±0,1	3,3±0,0	3,4±0,1	3,5±0,0
16	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	1529	5,8±0,0	9,7±0,0	6,6±0,4	9,0±0,0
17	<i>Flammulina velutipes</i>	47	4,4±0,1	4,7±0,2	6,3±0,1	6,4±0,2
18	- " -	50	4,4±0,1	4,4±0,2	5,3±0,2	5,0±0,3
19	- " -	1668	3,7±0,1	4,4±0,3	3,2±0,2	5,3±0,3

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
20	<i>Fomitopsis pinicola</i>	1523	5,5±0,1	6,9±0,1	4,4±0,3	7,7±0,4
21	<i>Ganoderma applanatum</i>	920	6,3±0,3	-	8,2±0,4	3,8±0,4
22	<i>G. lucidum</i>	921	5,5±0,0	4,9±0,1	9,4±0,2	3,4±0,1
23	- " -	922	5,3±0,4	4,9±0,2	5,6±0,3	4,0±0,2
24	- " -	1607	9,6±0,1	7,5±0,1	9,3±0,3	7,0±0,1
25	- " -	1608	7,1±0,3	5,7±0,3	5,2±0,1	7,1±0,3
26	- " -	1621	9,3±0,1	9,1±0,3	11,3±0,1	11,8±0,2
27	<i>Grifola frondosa</i>	332	3,7±0,2	5,0±0,1	4,7±0,3	6,7±0,3
28	- " -	923	3,1±0,1	3,2±0,1	4,3±0,2	3,9±0,2
29	- " -	962	3,1±0,4	4,2±0,2	3,2±0,1	3,8±0,3
30	- " -	976	3,1±0,6	4,1±0,2	3,1±0,1	3,9±0,1
31	<i>Hericium erinaceus</i>	963	3,5±0,1	3,8±0,1	-	3,1±0,0
32	- " -	964	3,3±0,1	2,9±0,2	-	3,3±0,0
33	- " -	965	4,3±0,5	4,3±0,0	4,0±0,1	3,5±0,1
34	- " -	966	3,3±0,1	1,8±0,2	3,0±0,0	3,6±0,1
35	- " -	967	3,3±0,2	2,7±0,1	-	2,8±0,1
36	- " -	968	3,3±0,0	2,9±0,3	-	3,7±0,2
37	- " -	969	3,2±0,1	3,2±0,1	3,0±0,0	2,6±0,3
38	- " -	970	1,9±0,1	2,4±0,0	2,8±0,2	1,4±0,3
39	- " -	971	3,0±0,2	3,0±0,1	-	2,3±0,0
40	- " -	986	3,8±0,4	3,2±0,2	3,7±0,1	4,2±0,4
41	- " -	1606	5,7±0,4	0,4±0,2	4,2±0,3	2,5±0,2
42	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	1610	3,1±0,3	3,3±0,2	3,6±1,2	3,2±0,2

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
43	<i>Hypsizygos marmoreus</i>	1611	3,0±0,1	2,7±0,4	2,8±0,2	3,4±0,1
44	- " -	1612	3,3±0,2	4,0±0,6	3,8±0,3	3,7±0,4
45	- " -	1656	1,8±0,4	1,3±0,1	1,2±0,4	1,4±0,2
46	<i>Irpex lacteus</i>	354	6,2±0,2	8,5±0,0	5,8±0,0	8,9±0,0
47	<i>Kuehnero- myces mutabilis</i>	58	4,4±0,1	7,9±0,6	-	5,9±0,2
48	<i>Lentinus edodes</i>	55	4,0±0,7	3,3±0,1	2,8±0,2	4,7±0,4
49	- " -	57	4,2±0,7	3,4±0,1	0,5±0,1	4,4±0,3
50	- " -	507	3,0±0,2	4,0±0,0	0,9±0,1	4,0±0,3
51	- " -	711	3,8±0,1	3,5±0,3	0,2±0,1	5,0±0,3
52	- " -	712	3,9±0,2	3,6±0,5	0,4±0,1	5,3±0,4
53	- " -	713	1,9±0,2	2,9±0,1	0,7±0,5	5,3±0,1
54	- " -	714	2,6±0,2	2,6±0,3	0,8±0,3	5,1±0,5
55	- " -	717	4,1±0,4	3,6±0,5	0,3±0,1	5,5±0,2
56	- " -	718	1,5±0,2	2,2±0,3	0,2±0,1	2,5±0,2
57	<i>Lentinus edodes</i>	1534	5,4±0,0	5,4±0,1	2,2±0,1	5,4±0,0
58	- " -	1626	4,3±0,2	4,0±0,2	0,4±0,2	5,4±0,2
59	- " -	1627	2,4±0,1	3,5±0,2	0,2±0,2	5,7±0,2
60	<i>Lenzites betulina</i>	1001	6,0±0,1	9,4±0,0	5,2±0,3	7,3±0,2
61	<i>Lyophyllum ulmarium</i>	113	5,1±0,1	8,3±0,3	8,2±0,2	8,7±0,3
62	<i>Marasmius alliaceus</i>	77	2,1±0,1	0,7±0,2	0,7±0,1	1,9±0,4
63	- " -	247	1,2±0,3	1,7±0,2	0,7±0,2	1,6±0,2
64	<i>M. androsaceus</i>	136	1,7±0,4	1,3±0,2	1,1±0,3	1,8±0,2

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
65	<i>Marasmius scorodoni</i>	78	2,9±0,4	2,6±0,5	3,9±0,2	2,9±0,4
66	<i>Oudemansiella mucida</i>	223	3,5±0,1	5,3±0,2	5,0±0,2	4,7±0,3
67	<i>O. radicata</i>	80	4,0±0,2	3,1±0,0	3,8±0,1	4,6±0,2
68	- " -	222	5,8±0,4	4,1±0,0	3,1±0,1	6,3±0,4
69	<i>Panus conchatus</i>	81	4,7±0,4	6,7±0,7	2,9±0,1	7,6±0,7
70	- " -	135	1,0±0,3	0,7±0,1	1,3±0,2	5,4±0,3
71	<i>P. tigrinus</i>	83	6,5±0,3	3,7±0,2	5,1±0,3	10,3±0,2
72	- " -	131	6,8±0,1	5,7±0,4	9,9±0,2	8,4±0,3
73	- " -	201	7,1±0,1	6,3±0,4	8,0±0,3	10,8±0,4
74	<i>Peniophora gigantea</i>	333	6,0±0,3	5,7±0,5	5,4±0,3	6,4±0,1
75	<i>Pholiota adiposa</i>	85	5,0±0,2	6,5±0,4	6,4±0,2	6,5±0,0
76	- " -	86	6,2±0,2	4,2±0,5	4,8±0,1	4,5±0,3
77	<i>Ph. nameko</i>	105	3,2±0,3	3,9±0,2	3,1±0,2	4,5±0,3
78	<i>Piptoporus betulinus</i>	1649	7,5±0,2	8,6±0,5	2,5±0,0	7,5±0,1
79	- " -	1653	7,2±0,4	1,0±0,7	6,2±0,2	7,9±0,4
80	- " -	1654	8,2±1,2	9,0±0,0	0,7±0,2	4,2±0,1
81	<i>Pleurotus abalonus</i>	221	1,2±0,2	3,3±0,3	2,3±0,2	3,3±0,3
82	<i>P. calyptratus</i>	189	7,3±0,3	10,2±0,2	8,2±0,4	8,2±0,1
83	<i>P. citrinopileatus</i>	1674	6,1±0,2	8,5±0,1	8,2±0,0	6,1±0,4
84	<i>P. columbinus</i>	188	3,4±0,5	7,4±0,4	5,7±0,1	6,5±0,6
85	<i>P. cornucopiae</i>	106	3,3±0,4	8,3±0,5	-	8,3±0,2
86	<i>P. djamor</i>	1526	10,1±0,5	9,5±1,1	16,9±0,4	15,7±0,3

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
87	<i>Pleurotus dryinus</i>	197	3,3±0,3	3,4±0,2	4,9±0,3	3,7±0,2
88	- "-	205	4,1±0,3	8,5±0,7	5,5±0,2	4,3±0,3
89	<i>P. eryngii</i>	10	4,9±0,6	6,1±0,1	4,7±0,2	5,2±0,5
90	- "-	165	4,5±0,2	4,9±0,3	4,3±0,2	5,1±0,4
91	- "-	193	4,7±0,8	5,5±0,3	4,2±0,5	5,3±0,1
92	<i>P. ostreatus</i>	90	5,5±0,3	10,2±0,3	8,5±0,4	7,4±0,5
93	- "-	133	6,9±0,2	11,3±0,3	8,5±0,4	8,4±0,7
94	- "-	236	6,7±0,1	9,7±0,4	7,7±0,3	7,3±0,2
95	- "-	295	7,9±0,2	8,3±0,3	8,5±0,3	9,7±0,3
96	- "-	297	4,4±0,4	9,5±0,2	8,7±0,4	9,4±0,1
97	- "-	530	5,2±0,5	11,8±0,4	9,9±0,3	7,6±0,5
98	- "-	540	8,2±0,2	7,1±0,2	8,4±0,6	8,0±0,1
99	- "-	544	4,7±0,5	9,7±0,2	9,3±0,2	9,7±0,4
100	- "-	716	6,9±0,4	7,6±0,4	9,3±0,4	7,3±0,3
101	- "-	1010	7,7±0,3	7,7±0,3	9,5±0,3	7,8±0,6
102	- "-	1013	6,9±0,3	8,3±0,4	9,3±0,2	8,1±0,5
103	- "-	1016	4,9±0,3	9,9±0,6	8,9±0,2	9,0±1,3
104	- "-	1017	5,1±0,8	9,5±0,3	11,1±0,2	7,3±0,3
105	- "-	1535	8,5±0,0	10,4±0,2	9,3±0,4	9,8±0,4
106	- "-	1543	5,3±0,2	4,8±0,1	5,7±0,5	5,0±0,2
107	- "-	1632	3,5±0,3	10,2±0,3	8,7±0,6	8,4±0,3
108	- "-	1633	3,8±0,3	7,9±0,4	9,3±0,4	4,8±0,5
109	- "-	1634	4,7±0,4	9,8±0,4	9,1±0,5	8,2±0,5
110	- "-	1635	6,2±0,3	9,7±0,4	9,1±0,2	8,1±0,5
111	- "-	1636	7,7±0,4	8,7±0,4	7,7±0,3	9,4±0,3
112	- "-	1637	7,6±0,1	9,4±0,3	9,1±0,7	7,4±0,2

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
113	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1638	8,1±0,4	10,3±0,3	9,0±0,4	8,4±0,0
114	- " -	1684	4,6±0,6	5,0±0,3	6,5±0,5	6,6±0,1
115	- " -	1685	7,5±0,4	7,0±0,1	7,2±0,6	5,8±0,4
116	<i>P. ostreatus</i> var <i>florida</i>	276	4,5±0,4	8,7±0,3	8,2±0,3	7,1±0,1
117	<i>P. pulmonarius</i>	111	2,7±0,3	8,7±0,2	7,2±0,4	5,5±0,5
118	- " -	230	5,0±0,7	7,4±0,5	8,2±0,2	6,3±0,4
119	<i>P. salignus</i>	181	4,2±0,4	8,0±0,5	8,5±0,2	7,0±0,6
120	- " -	182	5,7±0,3	10,8±0,2	10,3±0,2	6,7±0,5
121	<i>Psilocybe cubensis</i>	949	1,6±0,0	3,6±0,0	-	2,9±0,1
122	- " -	994	2,5±0,1	4,3±0,0	4,3±0,1	3,1±0,1
123	<i>P. cyanescens</i>	228	0,4±0,1	0,8±0,1	0,6±0,0	-
124	- " -	925	0,5±0,2	1,1±0,1	-	0,5±0,0
125	<i>P. semilanceata</i>	229	2,3±0,2	2,7±0,2	-	2,7±0,3
126	<i>Schizophyllum commune</i>	96	4,3±0,1	11,3±0,1	8,0±0,2	5,1±0,2
127	- " -	335	7,3±0,1	7,4±0,0	5,8±0,3	6,2±0,2
128	<i>Trametes multicolor</i>	1525	7,9±0,1	7,5±0,0	6,2±0,2	8,8±0,4
129	- " -	1561	10,3±0,5	9,4±0,3	9,3±0,3	6,7±0,4
130	<i>T. suaveolens</i>	1524	7,6±0,4	7,4±0,5	8,7±0,3	8,4±0,1
131	<i>Volvariella volvaceae</i>	1605	2,2±0,3	8,5±0,5	12,0±0,7	5,0±0,2

«-» – Статистически достоверные данные отсутствуют; полужирным шрифтом отмечена максимальная скорость роста для каждого штамма.

Так, например, группу условно быстрорастущих культур, скорость роста которых на тех или других средах превышает 8 мм/сут в стандартных условиях проведения экспериментов, составили 23 штамма, которые принадлежат к 7 видам: *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus djamor*, *P. ostreatus*, *Panus tigrinus*, *Volvarella volvaceae*, *Trametes multicolor* и *T. suaveolens*. К медленнорастущим культурам можно отнести 36 штаммов, 15 видов, среди которых были не только копротрофы и почвенные сапротрофы родов *Psilocybe*, *Marasmius* и *Coprinus*, но и такие ценные виды лекарственных грибов из экологической группы ксилотрофов, как *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus marmoreus*, а также *Lentinus edodes*. Другие исследованные культуры имели средние значения скорости роста мицелия, которые составляли от 4 до 8 мм/сут.

Учитывая данные максимальной скорости роста культур, отмеченные в табл. 1, полученный фактический материал можно рассматривать и в другом аспекте. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что состав агаризованных сред существенно влияет на скорость роста 78% исследованных культур и для каждой из них можно отметить такую или такие среды, которые являются наиболее благоприятными. Для 30% исследованных культур максимальную скорость роста обеспечивала лишь одна из использованных сред. Для других исследованных культур грибов одинаковая максимальная скорость роста наблюдалась на двух или трех средах. Например, мицелий *Hericium erinaceus* 966 рос с одинаковой скоростью на СА и КГА, *Auricularia auricula-judae* 961 – на ПА и КГА, *Agrocybe aegerita* 960 – на СА, ПА и ОА, *Pleurotus ostreatus* 1535 – на СА, ПА, ОА и КГА. В целом, у 22% культур скорость роста мицелия статистически не отличалась и была одинаковой на всех испытанных средах. Это такие культуры, как *Daedalea quercina* 350, *Flammulina velutipes* 50, 1668, *Grifola frondosa* 962 и большинство штаммов *Hericium erinaceus*.

Агаризованное пивное сусло (СА), которое широко применяется отечественными исследователями как универсальная среда для хранения культур в коллекции и для характеристики культурально-морфологических признаков базидиомицетов (Дудка и др., 1976; Бисько и др., 1983; Бухало, 1988; Бухало и др., 2006), в наших исследованиях также обеспечивало достаточно высокую среднюю скорость роста мицелия подавляющего боль-

шинства исследованных культур, хотя лишь для 21% из них на СА была получена максимальная скорость роста. Среди них – штаммы *P. betulinus*, *H. erinaceus*, *A. aegerita*, *G. lucidum* и др. Пшеничный агар, овсяный и картофельно-глюкозный агар обеспечивали максимальную скорость роста у 49, 43 и 37% исследованных культур соответственно. Эти среды оказались более селективными для разных таксономических групп грибов. Так, например, ПА и ОА были оптимальными для роста мицелия разных видов рода *Pleurotus*. В частности, скорость роста мицелия отдельных штаммов *P. ostreatus* достигала на этих средах 10-12 мм/сут. ПА обеспечивал максимальную скорость роста видов *Agrocybe aegerita*, *Auricularia auricula-judae*, *Lenzites betulina*, *Piptoporus betulinus*, *Psilocybe* spp. и некоторых других. ОА обеспечивал максимальную скорость роста *Ganoderma lucidum*, *G. applanatum*, *Coprinus* spp., *Volvariella volvaceae*, но оказался совсем неблагоприятным для роста мицелия всех штаммов вида *Lentinus edodes*. Среди культур, которые лучше росли на КГА, можно отметить штаммы *Auricularia polytricha*, *Lentinus edodes*, *Hericium erinaceus*, *Oudemansiella radicata*, *Panus conchatus*, *P. tigrinus*, *Trametes multicolor*. Среди культур ценного лекарственного вида *L. edodes* внимание привлекают штаммы 711, 712, 713, 714, 717 и 1628, максимальная скорость роста которых на КГА достигала 6 мм/сут. В то же время, КГА оказался менее благоприятной средой для роста большинства культур рода *Ganoderma*, за исключением *G. lucidum* 1608 и 1621.

Сопоставление полученных данных с источниками поступления культур в ИВК-коллекцию, указанными в Каталоге (Бухало и др., 2006), показало следующее. Для видов с широким ареалом распространения в природе, таких как *Pleurotus ostreatus* и *Ganoderma lucidum*, представленных в коллекции штаммами разного географического происхождения, отмечается достаточно широкий диапазон колебания значений скорости роста у разных штаммов даже на одинаковой среде. Так, например, скорость роста штаммов *G. lucidum* на СА колебалась от 5,3 до 9,3 мм/сут, а у *P. ostreatus* – от 3,5 до 8,5 мм/сут, что может свидетельствовать о различиях в физиологических свойствах культур одного вида.

Полученная в ходе исследования информация важна и для возможного практического использования тех или иных культур ИВК-коллекции, поскольку может служить критерием

для отбора отдельных наиболее перспективных штаммов среди конкретных видов съедобных и лекарственных грибов – объектов современного грибоводства и биотехнологии получения лекарственных препаратов (Chang, 1993; Ломберг, Соломко, 2006). Быстрорастущие штаммы, как известно, более конкурентоспособны и имеют серьезные технологические и экономические преимущества на всех этапах технологического процесса. Интенсивное культивирование ряда ценных, но медленно растущих видов или штаммов грибов требует полной стерилизации субстратов и особого внимания к созданию благоприятных условий для более быстрого роста вегетативного мицелия (Stamets, 1993, 2000).

Наибольшую группу быстрорастущих штаммов из исследованных нами объектов современного мирового грибоводства представляют культуры вида *P. ostreatus*, отдельные коллекционные штаммы которого уже широко используются в грибоводстве Украины. Если рассматривать перспективы использования в отечественном грибоводстве представителей других видов рода *Pleurotus*, то стоит обратить внимание на *P. citrinopileatus* 1674 и *P. cornucopiae* 106, которые на ряде сред демонстрируют достаточно высокую скорость роста. Заслуживает внимания и штамм вида *P. djamor* 1526, который используется в любительском грибоводстве стран Южной Америки и США. Среди исследованных коллекционных штаммов несъедобных лекарственных грибов, безусловно, перспективными для биотехнологического использования являются, на наш взгляд, быстрорастущий штамм *G. lucidum* 1621, культуры видов рода *Trametes*, а также *Schizophyllum commune*. Плодовые тела и мицелиальная биомасса культур указанных видов широко используются в производстве различных лечебно-профилактических препаратов и пищевых добавок.

Объектами мирового промышленного грибоводства и биотехнологии получения лекарственных препаратов из плодовых тел и мицелия давно стали и такие относительно медленно растущие виды, как *Lentinus edodes*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygos marmoreus*, *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus eryngii* и другие. Имеется много работ, посвященных изучению условий, благоприятных для активного роста мицелия и плодоношения различных видов съедобных и лекарственных грибов, результаты которых обобщены в ряде монографий (Chang,

Таблица 2. Температурные условия, необходимые для роста вегетативного мицелия и плодоношения отдельных видов съедобных и лекарственных грибов (Chang, Miles, 1989, 2004)

Вид	Рост мицелия		Плодоношение	
	а	б	а	б
<i>Auricularia auricula</i>	15-34	(28)	15-28	(22-25)
<i>A. polytricha</i>	10-36	(20-34)	15-28	(24-27)
<i>Flammulina velutipes</i>	3-34	(18-25)	6-18	(8-12)
<i>Hericium erinaceus</i>	12-33	(21-25)	12-24	(15-22)
<i>Lentinus edodes</i>	5-35	(24)	6-25	(15) осенние штаммы
				(10) зимние
				(20) весенние
<i>Pholiota nameko</i>	5-32	(24-26)		(7-10) (8-20) высокотемпературные штаммы, (5-15) низкотемпературные
<i>Pleurotus ostreatus</i>	7-37	(26-28)		(25-30) высокотемпературные штаммы
				(16-22) среднетемпературные
				(12-15) низкотемпературные
<i>P. sajor-caju</i>	14-32	(25-27)	10-26	(19-21)
<i>Volvariella volvacea</i>	15-45	(32-35)	22-38	(28-32)

а – Диапазон колебаний зависит от среды, других условий культивирования, свойств штаммов и способа хранения; б – оптимальные значения.

Hayes, 1978; Chang, Miles, 1989, 2004). Они свидетельствуют о достаточно большом диапазоне колебания оптимальных значений температуры (табл. 2) и pH среды (табл. 3) для роста разных штаммов одного и того же вида, что требует проведения соответствующих исследований для каждого потенциального продуцента. Большинство о влиянии условий культивирования на рост вегетативного мицелия макромицетов получены в исследованиях, проведенных на стандартизованных по опре-

делённым параметрам агаризованных средах, производимых рядом зарубежных фирм.

Таблица 3. Значения pH среды (субстрата), благоприятные для роста мицелия и плодоношения отдельных видов съедобных и лекарственных грибов (Chang, Miles, 1989, 2004)

Вид	Рост мицелия ^{а,б}		Плодоношение ^{а,б}
<i>Auricularia auricula</i>	3,5-8,5	(4,5-7,5)	-
<i>A. polytricha</i>	2,8-9,0	(5,0-5,4)	-
<i>Flammulina velutipes</i>	4,0-8,0	-	5,2-7,2
<i>Hericium erinaceus</i>	2,4-5,4	(4,0)	-
<i>Lentinus edodes</i>	4,4-7,5	(4,7-4,8)	(4,2-4,6)
<i>Pholiota nameko</i>	-	(5,0-7,0)	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	(5,4-6,0)	-
<i>P. sajor-caju</i>	-	(6,0-6,5)	-
<i>Volvarellia volvacea</i>	5,0-8,5	(7,5)	(7,6-8,0)

а, б – как и в табл. 2; “-” – данные отсутствуют.

Так, рекомендации о наиболее благоприятных агаризованных средах для получения маточной культуры для производства посевного мицелия более 20 видов культивируемых грибов представлены, в частности, в монографиях П. Стаметса (Stamets, 1993, 2000). Данные о скорости роста отдельных культур макромицетов из IBK-коллекции на широко используемых коммерческих средах были опубликованы ранее (Solomko et al., 1998; Bilay et al., 2000).

Для отобранных в ходе нашего исследования штаммов ряда видов лекарственных грибов было проведено специальное исследование скорости роста мицелия на коммерческих мальт-экстракт агаре (МЕА, pH 5,4) и картофельно-декстрозном агаре (PDA, pH 5,6) фирмы Oxoid (Англия), а также мальт-экстракт-пептонном агаре (МРА, pH 5,4) и мальт-экстракт-дрожжевом-пептонном агаре (МУРА, pH 6,0) с компонентами производства фирмы Merk (Германия) в сравнении со скоростью роста этих культур на агаризованных средах, которые чаще используются в практике отечественных лабораторий.

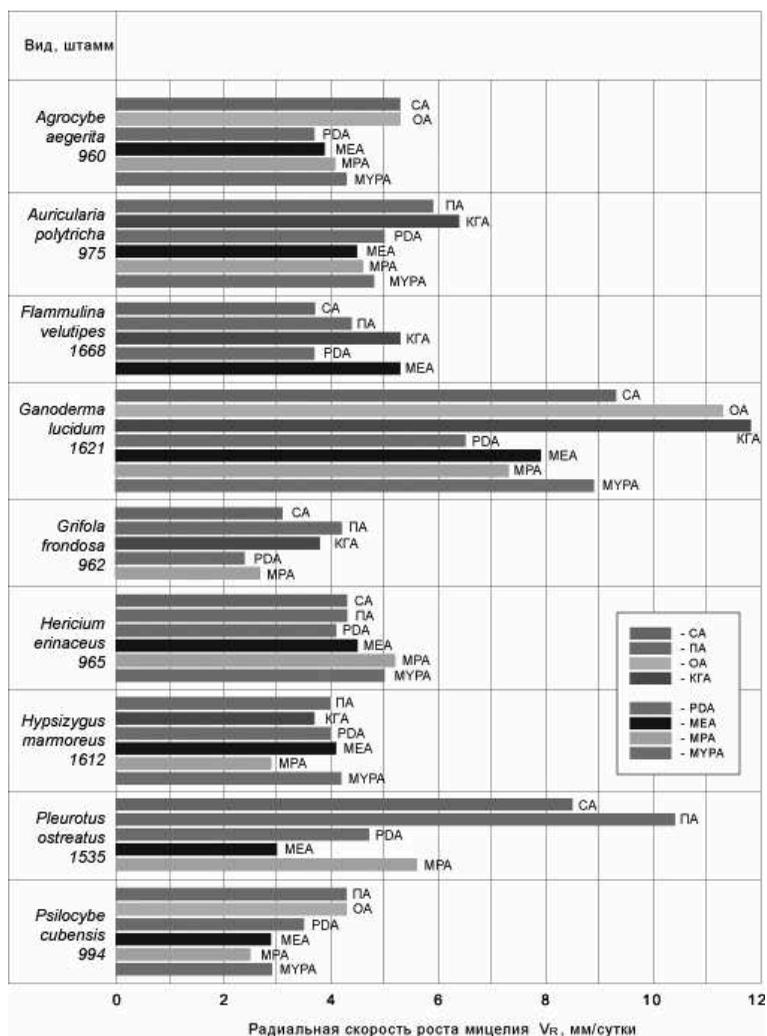


Рис. 3. Максимальная скорость роста культур грибов на средах различного состава

Полученные результаты (рис. 3) свидетельствуют о том, что в большинстве случаев коммерческие импортные агаризованные среды не имеют существенных преимуществ с позиции использования их в практике получения посевного мицелия, в т.ч. и для медленно растущих видов. Однако использование их в научных исследованиях позволяет сопоставить полученные данные с результатами работ других исследователей. Так, например, наши данные вполне согласуются с приведенными в литературе сведениями (Stamets, 2000) в отношении коммерческих сред, благоприятных для роста мицелия видов *Ganoderma lucidum* (МЕА), *Hericium erinaceus* (МУРА) и др.

Таблица 4. Время, необходимое для получения инокулюма грибов на агаризованных средах при 26 °С

Вид	Штамм	Время культивирования, сут			
		СА	ПА	ОА	КГА
<i>Agrocybe aegerita</i>	167	9	7	7	10
	960	9	9	9	10
<i>Auricularia auricula-judae</i>	961	13	8	*	9
<i>A. polytricha</i>	517	7	7	7	7
<i>Flammulina velutipes</i>	1668	12	12	13	11
<i>Ganoderma lucidum</i>	1607	6	6	6	7
	1621	7	7	6	6
<i>Grifola frondosa</i>	962	13	12	13	12
<i>Hericium erinaceus</i>	965	10	10	10	11
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	1612	13	12	12	12
<i>Lentinus edodes</i>	1534	9	9	*	9
	1626	11	12	*	8
<i>Pleurotus djamor</i>	1526	5	5	3	3
<i>P. ostreatus</i>	1535	6	5	5	5
	1638	7	6	6	6

* – Менее благоприятные среды.

Полученные результаты позволяют констатировать, что такие доступные и недорогие среды, как ПА, ОА, КГА и СА, могут использоваться в производстве посевного мицелия тех или других новых для грибоводства Украины видов съедобных грибов. При этом минимальное время культивирования, необходимое для получения физиологически активной маточной культуры на агаризованных средах у ряда отобранных из IBK-коллекции штаммов съедобных и лекарственных грибов (табл. 4), не превышает сроков, которые указываются в литературе для выращивания культур соответствующих видов (Yang, Jong, 1989; Stamets, 2000).

Такие физико-химические факторы, как температура, pH, влажность, концентрация CO₂, свет также влияют на скорость роста вегетативного мицелия грибов и на их способность к плодоношению. Определение и соблюдение оптимальных параметров культивирования является неотъемлемой частью современной технологии получения мицелиальной биомассы или плодовых тел съедобных и лекарственных грибов.

Результаты детальных исследований влияния температуры и pH сред на рост ряда отобранных коллекционных культур видов *Lentinus edodes*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygyus marmoreus*, *Agrocybe aegerita*, *Ganoderma lucidum* и др., представленные в наших публикациях (Ломберг, 2002, 2005; Соломко, Ломберг, 2007; Grigansky et al., 1999; Lomberh et al., 2000, 2002, 2003), вполне согласуются с выводом, вытекающим и из рассмотрения данных литературы (см. табл. 2, 3 и 5) о том, что оптимальные значения параметров культивирования различных штаммов одного и того же вида могут существенно отличаться. Данные об оптимальном значении pH для роста культур отдельных видов в этих сводках отсутствуют.

Нами установлено, что оптимальные значения pH для роста четырех исследованных штаммов *Hypsizygyus marmoreus* составляли около 7,2; для *Agrocybe aegerita* 960 – pH 6,3. Для *Grifola frondosa* оптимальными были pH 5,0-5,5 или 6,7; а для *Ganoderma lucidum* – около 5,0 или 6,2 в зависимости от штамма. Для коллекционного штамма *Auricularia polytricha* 975 оптимальное pH было 5,5, что несколько ниже, чем приведенное в литературе, а полученные данные о pH, оптимальных для роста отобранных штаммов *Hericium erinaceus* и *Lentinus edodes*, вполне согласуются с имеющимися в литературе (табл. 5).

Таблица 5. Рекомендации в отношении условий культивирования отдельных видов съедобных и лекарственных грибов (Stamets, Chilton, 1983; Stamets, 1993, 2000)

Вид	Этап выращивания мицелия		Этап плодоношения*		Выход ПТ, % массы субстрата
	рН	T, °C	T, °C	Освещение, люкс	
<i>Agrocybe aegerita</i>	-	21-27	13-18	500-1000	17-20
<i>Auricularia polytricha</i>	6,5-7,0	24-30	21-30	500-1000	4,8-10
<i>Flammulina velutipes</i>	4,0-5,0	21-24	10-16	20-50	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	-	21-27	21-27	750-1500	8,7
<i>Grifola frondosa</i>	-	21-24	13-16	500-1000	7-29
<i>Hericum erinaceus</i>	5,0-6,5	21-24	18-24	500-1000	24
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	-	21-24	13-18	400-600	10
<i>Lentinus edodes</i>	5,5-6,0	21-27	16-18	500-2000	25

* – Рекомендован субстрат из смеси древесных опилок и стружек с добавлением источников органического азота; ПТ – плодовые тела; «-» – данные не приводятся.

Опыт интенсивного культивирования в природных условиях ряда видов съедобных и лекарственных грибов, относящихся к экологической группе ксилотрофов, давно существовал в Китае и Японии (Chang, 1993; Chang, Miles, 2004).

В 60-70-х годах XX ст. для их культивирования стали широко применять интенсивные методы, что позволило странам Юго-Восточной Азии стать основными производителями и экспортёрами плодовых тел ряда “экзотических” видов, экстрактов и профилактических препаратов из них на мировом рынке. Такие виды, как *L. edodes*, *F. velutipes*, *G. frondosa*, *Ganoderma* spp.,

Auricularia spp., *H. erinaceus* и др. стали культивировать в небольших по объему сосудах или пакетах на стерильных субстратах, что обеспечивало благоприятные условия для роста мицелия видов с низкой конкурентоспособностью. В этих странах применяли, как правило, субстраты, приготовленные на основе опилок определённых пород деревьев с добавлением от 20 до 50% отходов переработки сельского хозяйства, характерных для того или иного региона (очёсы хлопка, отходы переработки риса, чая, цитрусовых, бананов, ананасов и т.п.). Для плодоношения большинства ксилотрофных видов культивируемых грибов предлагается использовать универсальную композицию субстрата, состоящую из опилок лиственных пород деревьев (ольха, тополь, осина, берёза и т.д.), смешанных со стружкой или мелкой щепой в соотношении 2:1, обогащенных азотсодержащими добавками (Stamets, Chilton, 1983). Определённые рекомендации для роста мицелия и плодоношения ряда видов грибов на указанном субстрате обобщены в табл. 5.

Поскольку ресурсы древесины довольно ограничены, а в отдельных регионах и вовсе отсутствуют, интерес к разработке методов культивирования ксилотрофных видов, основанных на использовании альтернативных субстратов, т.е. субстратов из различных ежегодно возобновляемых лигноцеллюлозных отходов сельскохозяйственного производства, очень велик и требует, по мнению ряда авторов (Chang, Miles, 1989, 2004; Chang, 1993; Zervakis et al., 2001), проведения специальных исследований в различных регионах. Украина имеет большой сырьевой потенциал для развития грибоводства и проверка способности к плодоношению новых видов и штаммов съедобных и лекарственных грибов, в т.ч. на альтернативных субстратах, безусловно, актуальна (Соломко и др., 2005; Ломберг, Соломко, 2006). Наши тестовые лабораторные исследования показали, что зерно пшеницы является наиболее универсальным субстратом для производства посевного мицелия различных видов, а стерильный классический субстрат на основе опилок (при оптимальных температурных режимах) обеспечивает плодоношение всех отобранных штаммов. Из числа испытанных разнообразных альтернативных субстратов наиболее благоприятным и универсальным для всех исследованных видов ксилотрофов оказалась лузга семян подсолнечника, колонизация которой мицелием грибов проходила,

как правило, быстрее, чем контрольного субстрата из обогащенных опилок (табл. б), а сроки появления плодовых тел соответственно сокращались. Плодоношение ряда видов на этом и других субстратах показано на рис. 4.

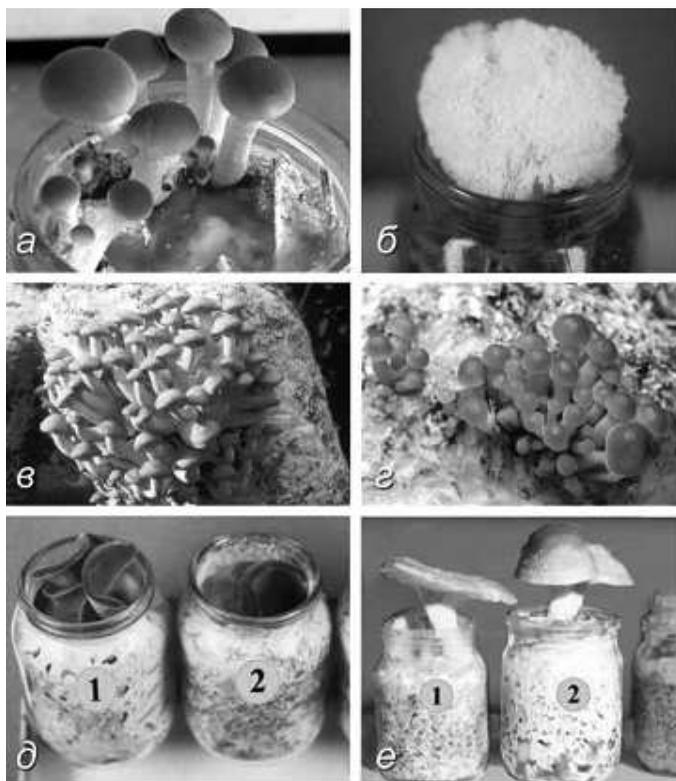


Рис. 4. Плодоношение селективированных штаммов съедобных и лекарственных грибов на растительных субстратах: а – *Agrocybe aegerita* 960 на лузге подсолнечника; б – *Hericium erinaceus* 963 на опилках с 10% пшеничных отрубей; в – *Hypsizyguis marmoreus* 1612 на опилках с 20% кукурузной муки; г – *Flammulina velutipes* 1668 на лузге подсолнечника; д – *Auricularia polytricha* 975 на лузге подсолнечника (1), на пшеничной соломе (2); е – *Lentinus edodes* 1534 на опилках с 10% пшеничных отрубей (1), на лузге подсолнечника (2)

Таблица 6. Сроки обрастания субстратов мицелием ряда отобранных культур макромицетов

Вид, штамм	Время полного обрастания субстратов мицелием, сут						
	Зерно пшеницы	Зерно проса	Лузга подсолнечника	Пшеничная солома	Початки кукурузы	Древесные опилки	Древесные опилки + пшеничные отруби
<i>Agrocybe aegerita</i> 960	15	22	22	19	22	>30	30
<i>Auricularia auricula-judae</i> 961	15	19	22	19	26	>30	30
<i>A. polytricha</i> 975	12	15	19	15	22	30	26
<i>Flammulina velutipes</i> 1668	14	-	17	-	-	30	21
<i>Ganoderma lucidum</i> 922	21	21	24	17	-	>30	24
<i>G. lucidum</i> 1621	15	-	19	-	-	-	19
<i>Grifola frondosa</i> 962	>30	30	24	24	24	>30	>30
<i>Hericium erinaceus</i> 963	14	17	17	21	17	>30	21
<i>Hypsizygus marmoreus</i> 1612	19	-	20	>30	-	>30	22
<i>Lentinus edodes</i> 1534	14	-	21	-	25	>30	30

"-" – Исследования не проводились.

Список литературы

- Билай В.И.** Основы общей микологии. – Киев: Вища шк., 1980. – 360 с.
- Бисько Н.А., А.С. Бухало, С.П. Вассер и др.** Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. – Киев: Наук. думка, 1983. – 312 с.
- Бисько Н.А., Дудка И.А.** Биология и культивирование съедобных грибов рода Вешенка. – Киев: Наук. думка, 1987. – 147 с.
- Бухало А.С.** Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.
- Бухало А.С., Митропольська Н.Ю. Михайлова О.Б.** Каталог колекції культур шапинкових грибів (ІВК). – К.: Ін-т ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, НВФ “Славутич-дельфін”, 2006. – 36 с.
- Великанов Л.Л., Сидорова И.И.** Некоторые биохимические аспекты в экологии грибов // Усп. микробиол. – 1983. – № 18. – С. 112-132.
- Дудка І.О., Шепя В.В., Вассер С.П., Солдатова І.М., Фрід Ю.Ф., Ісаченко А.А., Скібицька Т.М.** Культуральні особливості штамів вищих базидіомицетів з родів *Pleurotus* (Fr.) Quél. та *Lentinus* Fr. // Укр. бот. журн. – 1976. – **33**, № 6. – С. 582-596.
- Кочкина Г.А., Мирчинк Т.Г., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г.** Радиальная скорость роста грибов в связи с их экологией // Микробиология. – 1978. – **47**, № 5. – С. 964-965.
- Ломберг М.Л.** Дослідження *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow (Agaricales) у культурі // Укр. бот. журн. – 2002. – **59**, № 3. – С. 292-298.
- Ломберг М.Л.** Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2005. – 20 с.
- Ломберг М.Л., Соломко Е.Ф.** Наукові засади інтродукції нових видів цінних їстівних та лікарських грибів у грибовництві України // Мат. І міжнар. спец. наук.-практ. конф. “Грибна індустрія”. – Київ, 2006. – С. 34-37.
- Методы** экспериментальной микологии: Справочник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 583 с.
- Паников Н.С.** Кинетика роста микроорганизмов. – М.: Наука, 1991. – 309 с.
- Перт С.Дж.** Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
- Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Чоловська О.В.** Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних сере-

- довищах різного складу // Укр. бот. журн. – 2000. – **57**, № 2. – С. 119-126.
- Соломко Э.Ф., Ломберг М.Л., Балагура А.Н.** Альтернативные субстраты для культивирования лекарственных грибов // Мат. 3-го Всерос. конгр. "Успехи медицинской микологии". – М., 2005. – Т. 5. – С. 223-226.
- Соломко Э.Ф., Ломберг М.Л.** Биология, культивирование и лекарственные свойства *Agrocybe aegerita* (Brig.) Singer // Усп. мед. микологии – М.: Нац. акад. микол., 2007. – Т. IX. – С. 259-261.
- Allan E.J., Prosser J.I.** A kinetic study of the colony growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) // J. Gen. Microbiol. – 1985. – **132**, N 6. – P. 2521-2532.
- Bilay V.T., Solomko E.F., Buchalo A.S.** Growth of edible mushrooms on commercial agar media // Mushroom Sci. / Ed. L. Van Griensven. – Maastricht (Netherlands): Balkena, 2000. – Vol. 15. – P. 779-782.
- Chang S.T.** Mushroom Biology: the impact on mushroom production and mushroom products // Mushroom Biology and Mushroom Products / Eds. S.T. Chang, J.A. Buswell, S.W. Chiu. – Hong Kong: Chin. Univ. Press, 1993. – P. 3-20.
- Chang S.T., Hayes W.A.** The biology and cultivation of edible mushrooms. – New York: Acad. Press, 1978. – 819 p.
- Chang S.T., Miles Ph.G.** Edible mushrooms and their cultivation. – Boca Raton: CRC Press, 1989. – 345 p.
- Chang S.T., Miles Ph.G.** Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. – London, etc.: CRC Press, 2004. – 451 p.
- Davidson F.A., Sleeman B.D., Rayner A.D.M., Crawford J.W., Ritz K.** Travelling waves and pattern formation in a model for fungal development // J. Mathem. Biol. – 1997. – **35**, N 5. – P. 589-608.
- Gooday G.W.** The dynamics of hyphal growth // Mycol. Res. – 1995. – **99**, N 4. – P. 385-394.
- Grigansky A.Ph., Solomko E.F., Kirchhoff B.** Mycelial growth of medicinal mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. in pure culture // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – **1**, N 1. – P. 81-87.
- Li Z.-G., Chen Y.-Y.** Identification of wood-inhabiting in pure culture // Acta Mycol. Sin. – 1984. – **3**, N 1. – P. 5-14.
- Lomberh M., Buchalo A., Solomko E., Grygansky A., Kirchhoff B.** Investigations of mycelium growth and fruit body development of different strains of the beech mushroom Shimeji (*Hypsizigus marmoreus*

- Bull.: Fries) Singer // Mushroom Sci. / Ed. L. Van Griensven. – Maastricht (Netherlands): Balkena, 2000. – Vol. 15. – P. 763-770.
- Lomberh M.L., Solomko E.F., Buchalo A.S., Kirchhoff B.** Studies of medicinal mushrooms in submerged culture // 4 Intern. Conf. Mushroom Biol. and Mushr. Products: Proc. – Cuernavaca (Mexico), 2002. – P. 367-378.
- Lomberh M.L., Renker C., Buchalo A.S., Solomko E.F., Kirchhoff B., Buscot F.** Micromorphological and molecular biological study of culinary-medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. (Agaricomycetidae) // Intern. J. Med. Mushr. – 2003. – 5, N 3. – P. 307-312.
- Reshetnikov S.V., Fjodorov O.A., Kotov V.N., Solomko E.F.** The relationship between growth parameters of *Pleurotus ostreatus* in the surface and submerged cultures // Abstr. X Congr. Europ. Mycol. – Tallinn, Estonian SSR, 1989. – 56 p.
- Solomko E.F., Buchalo A.S., Wasser S.P., Mitropolskaya N.Yu., Weis A.L.** Investigations on *Omphalotus olearius* (DC.: Fr.) Fay. (Agaricales s.l.) in pure culture // Ukr. Bot. J. – 1998. – 55, N 6. – P. 598-605.
- Stamets P.** Growing gourmet and medicinal mushrooms. – Ten Speed Press, CA, 1993. – 556 p.
- Stamets P.** Growing gourmet and medicinal mushrooms. – 3 ed. Ten Speed Press, CA, 2000. – 554 p.
- Stamets P., Chilton J.S.** The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home. – Olympia, Washington: Agar. Press, 1983. – 415 p.
- Weis A.L., Solomko E.F., Buchalo A.S., Wasser S.P., Mitropolskaya N.Yu., Gryganski A.P., Gorovits E.L.** Cultural study and illudin S production of medicinal mushroom *Omphalotus olearius* (DC.: Fr.) Fay. (Agaricales s.l.) from Israel // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – 1, N 1. – P. 93-103.
- Yang Q.Y., Jong S.C.** A quick and efficient method of making mushroom spawn // Mushroom Sci. / Eds. K. Grabbe, O. Hilber. – Braunschweig (Germany), 1989. – 12, Pt. I. – P. 317-324.
- Zervakis G., Philippoussis A., Ioannidou S., Diamantopoulou P.** Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushrooms species on lignocellulosic substrates // Folia Microbiol. – 2001. – 46, N 3. – P. 231-234.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА ВИДОВ РОДА *GANODERMA* P. KARST.

Т.А. Круподерова, Н.А. Бисько

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, 01601 Киев, Украина

СОКРАЩЕНИЯ

АОА – антиоксидантная активность

СА – агаризованное пивное сусло

ВТМ – вирус табачной мозаики

ГА – глюкозо-аспарагиновая среда

ГПД – глюкозо-пептонно-дрожжевая среда

ИБК – шифр Коллекции культур шляпочных грибов

Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины

Vr – скорость радиального роста мицелия, мм/сут

СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИДОВ РОДА *GANODERMA*

Перспективными продуцентами биологически активных веществ являются виды рода *Ganoderma*: *G. applanatum* (Pers.) Pat. и особенно *G. lucidum* (Curtis) P. Karst.

Эти космополитные виды грибов по характеру питания – сапротрофы. *G. applanatum* встречается на пнях и стволах многих лиственных деревьев из родов *Betula* L., *Alnus* Mill., *Salix* L., *Fagus* L., *Quercus* L., *Fraxinus* L., *Malus* Mill., редко – на хвойных породах деревьев (*Pinus* L., *Picea* A. Dietr., *Abies* Mill.), распространен на территориях стран СНГ, Европы, Центральной Азии, Южной и Северной Америки, Южной Африки, Австралии, на о. Цейлон, Филиппинах (Ryvarden, Gilberston, 1993). Хорошо

представлен и в Украине – растет на территории Карпат, в Прикарпатье, Западном, Правобережном и Левобережном Полесье, Ростоцко-Опильских Лесах, Западной, Правобережной и Левобережной Лесостепи, Горном Крыму (Визначник ..., 1971).

Ganoderma lucidum растет на деревьях из родов *Quercus* L., *Acer* L., *Alnus* Mill., *Betula* L., *Castanea* Mill., *Fagus* L., *Fraxinus* L., *Populus* L., *Carpinus* L., иногда на *Larix* L., *Picea* A. Dietr., *Pinus* L. вызывает белую неактивную гниль коррозийного типа, встречается почти во всех странах мира. На территории стран СНГ распространен в южных районах. Частые находки характерны для Кавказа, Средней Азии, Северной Америки, Африки (Ryvarden, Gilberston, 1993). В Украине *G. lucidum* найден в Карпатах, Западном Полесье, Ростоцко-Опильских Лесах, Западной, Правобережной, Донецкой и Крымской Лесостепи, Горном Крыму и Степи (Визначник ..., 1971).

Виды рода *Ganoderma* по системе, предложенной в 9-м издании „Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi“ (Kirk et al., 2001) относятся к семейству Ganodermataceae, порядку Polyporales, классу Basidiomycetes, отделу Basidiomycota царству Fungi; а по системе Д.С. Хиббета с соавт. (Hibbett et al., 2007) – порядку Polyporales, подклассу Phallomycetidae, классу Agaricomycetes, подотделу Agaricomycotina, отделу Basidiomycota, подцарству Dikarya царству Fungi.

Важным направлением микологических исследований является изучение систематики грибов. Среди полипоровых грибов род *Ganoderma* считают наиболее сложным относительно идентификации видов (Hong, Jung, 2004). Наличие разных макроморфологических признаков и в то же время отсутствие четких микроморфологических отличий усложняют определение их систематического положения. Выяснение таксономического положения видов рода *Ganoderma* освещено в работах разных исследователей (Adaskaveg, Gilberston, 1986, 1988; Moncalvo et al., 1995a, b, 2005; Wasser et al., 2005). Однако сегодня не существует единого мнения о количестве видов в данном роде: сообщается о 290 таксономических именах (Chang, 1999), более 250 видах (Wasser, Weis, 1997), 166 видах *Ganoderma*, из которых 48 названий являются синонимами (Moncalvo, 2005).

Классификация видов рода *Ganoderma* традиционно осно-

вываается преимущественно на макро- и микроморфологических признаках плодовых тел, базидиоспоры же являются наиболее важным признаком при идентификации видов (Furtado, 1965; Bazzalo, Wright, 1982; Hong, Jung, 2004; Wasser et al., 2006). Специфичность и определяющая роль морфологии базидиоспор в идентификации видов рода *Ganoderma* с использованием сканирующего электронного микроскопа подтверждены в работах многих исследователей (Perreau, 1973; Steyaert, 1977; Adaskaveg, Gilberston, 1986, 1988).

Использование классических критериев в таксономии данного рода, учитывая значительную фенотипическую пластичность и изменчивость морфологии видов рода *Ganoderma*, является недостаточным. Последние результаты исследований молекулярно-биологическим методом вносят ряд дополнений и уточнений в идентификацию критических видов. Ж.-М. Монкальво с соавт. (Moncalvo et al., 1995a, b), основываясь на результатах молекулярно-филогенетических исследований, считают, что большинство видов *G. lucidum* из коллекции Северной Америки следует отнести к *G. resinaceum* Boud. европейского происхождения. В то же время северно-американский вид *G. tsugae* Murrill. генетически очень близок к распространенному в Европе *G. lucidum*. Его штаммы из Кореи и Японии, согласно результатам исследований (Hong, Jung, 2004) рДНК митохондриальной малой субъединицы, отличаются от таковых из Европы и Северной Америки. В своей работе М.Л. Ломберг (2005), используя молекулярно-биологические методы, указала на 95%-е сходство двух штаммов *G. lucidum* разного географического происхождения – европейского (белорусский *G. lucidum* 921) и азиатского (китайский *G. lucidum* 1607). Установлено (Adaskaveg, Gilberston, 1986), что северно-американский штамм *G. lucidum* 430.84 и *G. resinaceum* 194.76 взаимоскрещиваются и поэтому принадлежат к одному биологическому виду. Это полностью противоречит результатам других исследователей (Moncalvo et al., 1995a, b), доказавших, что эти культуры согласно анализам исследований последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 генов филогенетически разместились в разные кластерные группы.

Учитывая накопленный банк данных о *G. lucidum*, дис-

куссионным все же остается вопрос, один это вид или комплекс видов. Существует мнение (Ryvarden, Gilberston, 1993), что в так называемой *G. lucidum* группе описано 220 видов. Результаты молекулярно-биологических исследований свидетельствуют о наличии комплекса видов *G. lucidum*, который состоит из европейского *G. valesiacum* Boud, *G. ahamdoo* Stey, описанного в Пакистане, северно-американского *G. tsugae* и *G. oregonense* Murrill., а также других видов – *G. resinaceum*, *G. oesterdi* Fr., *G. praelongum* Murrill. (Moncalvo, 2005).

В Аргентине по макро-, микроморфологическим и культуральным признакам выделили *G. lucidum* комплекс: *G. lucidum* s. str., *G. oerstedii*, *G. resinaceum*, *G. zonatum* Murr., *G. subamboinense* var. *laevisporum* M.E. Bazzalo & J.E. Wright (Bazzalo, Wright, 1982). Существует также мнение (Pegler, 2002) о комплексе очень близких видов *G. lucidum* – *G. sinense* Zhao, *G. japonicum* (Fr.) Lloyd и *G. neojaponicum* Imazeki. В Индии (Vaidya et al., 2001) сообщили о следующем видовом составе *G. lucidum* комплекса: *G. lucidum* var. *capense*, *G. personatum* Murrill., *G. curtisii* (Berk.) Murrill., *G. multiplicatum* (Mont.) Pat., *G. praelongum*, *G. orbiformum* (Fr.) Ryv., *G. stipitatum* (Murr.) Murrill.

По данным отечественных и зарубежных исследователей (Wasser et al., 2006), существует две основные ветви происхождения комплекса *G. lucidum*: *G. oregonense* – *G. tsugae* – *G. resinaceum*, для которых характерна гладкая, ровная поверхность базидиоспор с отверстиями неправильной формы и *G. valesiacum* – *G. carnosum* Pat. – *G. lucidum* с выраженной сморщенной, складчатой поверхностью.

Таким образом, для идентификации критических видов рода *Ganoderma* целесообразно использовать комплексный анализ макро- и микроморфологических признаков в сочетании с современными молекулярно-биологическими методами. Актуальным остается поиск дополнительных стабильных диагностических критериев.

1. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА ВИДОВ РОДА *GANODERMA*

Многовековой положительный опыт лечения людей с использованием грибов видов рода *Ganoderma* в странах Юго-

Восточной Азии стал стимулом для развития современных научных исследований. Официально всестороннее изучение *Ganoderma* spp. было начато в Китае в 1970 г. (Liu, 1999a). Современные данные проведенных экспериментов на животных и клинические наблюдения подтвердили уникальные лечебно-профилактические свойства *G. applanatum* (табл. 1) и особенно *G. lucidum* (табл. 2).

Таблица 1. Лечебно-профилактические свойства *Ganoderma applanatum*

Спектр использования	Терапевтическое действие / биологически активное соединение	Ссылка
1	2	3
Иммуно-модуляция	Антибактериальное	Денисова, 1998; Ковалева, 2009; Chang, Hayes, 1978; Wasser, Weis, 1999a, b; Ghorashi et al., 2003; Moradali et al., 2007;
	Антивирусное / тритерпены, РНК	Денисова, 1998; Соломко и др., 1997; Jones, 1990; Wasser, Weis, 1997; Wasser, Weis, 1999a, b; Gao et al., 2003
	Терапевтическое действие при аутоиммунных расстройствах	Денисова, 1998, Wasser, Weis, 1999a, b
	Антираковое / полисахариды	Денисова, 1998; Филимонова и др., 2002; Соломко, 2004; Chang, Hayes, 1978; Usui et al., 1983; Jones, 1990; Wasser, Weis, 1999a, b; Reshetnikov et al., 2001

1	2	3
Заболевания разной этиологии	Антиревматическое	Денисова, 1998; Chang, Hayes, 1978
	Гепатопротекторное	Денисова, 1998
	Обезболивающее	
	Жаропонижающее	
	Ослабление диспепсии	
	Фото- и радиопротекторное действие при лучевой терапии рака	
Препятствует появлению рака пищевода	Даниляк, Решетников, 1996; Соломко та ін., 1997; Денисова, 1998	

Терапевтическая активность видов *G. lucidum* и *G. applanatum* обусловлена наличием в этих грибах разных биологически активных компонентов. По данным исследователей (Mizuno, Sakamura, 1995a, b; Hobbs, 1996; Wasser, Weis, 1997; Boh et al., 2004; Russel, Paterson, 2006; Fu et al., 2009), в плодовых телах, вегетативном мицелии и спорах видов рода *Ganoderma* найдено более 400 химических компонентов с фармакологической активностью – полисахариды, тритерпеноиды, протеины/пептиды, аминокислоты, нуклеозиды, алкалоиды, стероиды, жирные кислоты, ферменты и микроэлементы (магний, кальций, цинк, марганец, железо, медь и германий).

Согласно известным публикациям (Wasser, Weis, 1997; Boh et al., 2004; Chen et al., 2004; Wasser et al., 2005), из плодовых тел, спор и мицелия *G. lucidum* изолировано более 100 типов полисахаридов. Отечественные и зарубежные исследователи (Автономова и др., 2006; Hobbs, 1996; Wasser, Weis, 1997; Boh et al., 2004; Chen et al., 2007) считают, что биологическое действие этих полисахаридов обусловлено принадлежностью их к разным классам: β -1-3, β -1-6-D-глюканам (рис. 1), гетероглюканам и гликопротеинам. Некоторыми учеными (Кожмякина и др. 2007; Ковалева, 2009; Boh et al., 2004) установлена противоопухолевая и иммуностимулирующая активность полисахаридов *G. lucidum* и водорастворимой фракции β -1-3-D-глюканов из мицелия *G. applanatum*.

Таблица 2. Лечебно-профилактические свойства *Ganoderma lucidum*

Спектр использования	Терапевтическое действие/ биологически активное соединение	Литературные ссылки
Подготовка космонавтов в России	Улучшает работу организма	Chen, Miles, 1996; Wasser, Weis, 1997, 1999a, b
	Способствует быстрому восстановлению нормальной физиологии	
Дополнительное средство при терапии рака	Удерживает лейкоцитный уровень	Chen, Miles, 1996; Wasser, Weis 1997, 1999a,b; Gao, Zhou, 2004a, b; Степаненко и др., 1998
	Улучшает иммунную систему	
	Способствует восстановлению после операционного состояния	
	Успокаивает, уменьшает боли и наркотическую зависимость онкопациентов	Chen, Miles, 1996; Wasser, Weis, 1997, 999a,b; Molitoris, 2005;
	Детоксикантное / тритерпе-ноиды / (уменьшает токсичность химиотерапии и радиации)	Chang, Hayes 1978; Chen, Miles, 1996; Soo, 1996; Chang, Buswell, 1999; Wasser, Weis, 1997, 1999a
Иммуно-модуляция	Антираковое / полисахариды, тритерпены, органический германий / и антиметастазное	Choong et al., 2008; Griensven, 2008; Rubel et al., 2008
Иммуно-модуляция	Антивирусное (включая редукцию репликации вируса СПИДа) / полисахариды, тритерпены, РНК	Chang, Hayes, 1978; Willard, 1990; Chang, 1993; Mizuno, 1995a, b; Chen, Miles, 1996; Ooi, Fang, 1999; Wasser, Weis, 1997, 1999a, b; Stamets,

		2000; Wasser et al., 2000; Russel, 2006; Постнова, 2008; Chen et al., 2008
	Антибактериальное / тритерпены	Chen, Miles, 1996; Mizuno, 1995a, b; Wasser, Weis, 1999a, b; Roberts et al., 2001; Gao et al., 2003; Russel, 2006
	Противовоспалительное/ тритерпены	Chang, Hayes, 1978 Willard, 1990; Chang, 1993; Mizuno, 1995a, b; Soo, 1996; Денисова, 1998; Liu, 1999b; Wasser, Weis, 1997, 1999a, b; Stamets, 2000; Бабицкая и др., 2003; Molitoris, 2005; Russel, 2006; Elgorashi et al., 2008; Ko et al., 2008
	Терапия аутоиммунных расстройств / полисахариды	Chang, Hayes, 1978; Willard, 1990; Chang, 1993; Soo, 1996; Со-ломко и др., 1997; Wasser, Weis, 1997, 1999a; Stamets, 2000; Molitoris, 2005
	Антиаллергенное / тритерпены, олеиновая кислота, циклоокта-сульфур, протеин (Ling Zhi-8) / (ингибирование освобождения гистамина и предотвращение анафилактического шока при аллергиях)	Chang, Hayes, 1978; Willard, 1990; Chen, Miles, 1996; Soo, 1996; Chang, Buswell, 1999; Wasser, Weis, 1997, 1999a; Бабицкая и др., 2003; Russel, 2006; Постнова, 2008
	Увеличение синтеза интерлейкина-2, интерферона-б	Willard, 1990; Liu, 1999a, b; Stamets, 2000; Bao et al., 2002; Wang et al., 2002; Russel, 2006; Ma et al., 2008

Заболевания разной этиологии	Увеличивает утилизацию кислорода / органический германий, который улучшает дискомфорт при тошноте, головной боли, головокружении, бессоннице	Chen, Miles, 1996; Soo, 1996; Wasser, Weis, 1997, 1999a; Денисова, 1998; Бабицкая и др., 2003; Molitoris, 2005
	Кардиологическое / алкалоиды, ганодеран С (увеличивает сердечную циркуляцию, частоту и амплитуду сердцебиения; регулирует кровяное давление в сочетании с другими медикаментами; антигипергликемическое и антигипогликемическое / тритерпены, полисахариды, антитромбоцитарное / тритерпены, аденозин) и уменьшает уровень холестерина / протеин-полисахариды	Степаненко и др., 1998; Бабицкая и др., 2003; Соломко 2004; Постнова, 2008; Chang, Hayes, 1978; Mizuno, 1995a, b; Chen, Miles, 1996; Soo, 1996; Денисова, 1998; Chang, 1999; Chang, Buswell, 1999; Liu, 1999b; Ooi, Fang, 1999; Wasser, Weis, 1997, 1999a; Stamets, 2000; Chang, Miles, 2004; Molitoris, 2005; Russel, 2006; Wasser et al., 2006
	Влияет на дыхательную систему (отхаркивающее средство, успокаивает кашель; облегчает астматические приступы; регенерирует бронхиальный эпителий)	Денисова, 1998; Бабицкая и др., 2003; Chang, Hayes 1978; Soo, 1996; Wasser, Weis, 1979, 1999b; Molitoris, 2005;
	Способствует появлению аппетита при анорексии	Molitoris, 2005
	Антидиабетическое (усиливает и продлевает действие инсулина), гипогликемическое и гиполлипидемическое / полисахариды	Mizuno, 1995a, b; Chen, Miles, 1996; Soo, 1996; Ooi, Fang, 1999; Wasser, Weis, 1997, 1999a, b; Wasser et al., 2000; Yang et al., 2001; Molitoris, 2005; Постнова, 2008; Griensven, 2008

	Гепатопротекторное / стероиды, полисахариды, ганодеровые кислоты, ганодеростерон (способствует регенерации печени, предупреждает некроз гепатоцитов при гепатитах)	Соломко и др., 1997; Денисова, 1998; Степаненко и др., 1998; Бабицкая и др., 2003, 2004; Chang, Hayes, 1978; Willard, 1990; Chang, 1993; Mizuno, 1995a, b; Chen, Miles, 1996; Soo, 1996; Chang, Buswell, 1999; Liu, 1999a; Ooi, Fang, 1999; Wasser, Weis, 1999a, b; Boh, 2002; Gao et al., 2002c; Molitoris, 2005; Russel, 2006; Chen et al., 2007; Griensven, 2008
Заболевания разной этиологии	Диуретическое	Денисова, 1998; Бабицкая и др., 2004; Gao et al., 2002c; Molitoris, 2005
	Адаптогенное / тритерпены (успокаивающее действует на центральную нервную систему, эффективно при невралгии, защищает от стрессов)	Даниляк, Решетников, 1996; Соломко и др., 1997; Денисова, 1998; Бабицкая и др., 2003; Soo, 1996; Wasser, Weis, 1997, 1999a; Molitoris, 2005
	Седативное	Денисова, 1998; Linghong et al., 2000; Lei et al., 2005
	Митогенетическое / лектины	Russel, 2006; Badalyan, Sakeyan, 2008
	Иммунодепрессивное / протеин («LZ-8»)	Russel, 2006
	Тонизирующее	Денисова, 1998
	Фото- и радиопротекторное/ полисахариды	Денисова, 1998; Mizuno, 1995b; Wasser, Weis, 1997, 1999a,b; Russel, 2006

Заболевания разной этиологии	Цитогенетическое	Денисова, 1998
	Цитотоксическое / тритерпены	Jones, 1999; Gao et al., 2002a; Russel, 2006
	Нормализирует работу ЖКТ, эффективный при язве желудка, слабительный эффект	Денисова, 1998; Бабицкая и др., 2003; Степаненко и др., 1998; Soo, 1996
	Антиоксидантное (уменьшает количество свободных радикалов кислорода) / полисахариды	Денисова, 1998; Бабицкая и др., 2004; Постнова, 2008; Chang, Hayes, 1978; Willard, 1990; Wasser, Weis, 1997, 1999a, b; Jones, 1999; Ooi, Fang, 1999; Stamets, 2000; Russel, 2006;
	Жаропонижающее	Soo, 1996
	Регенерирующее	Даниляк, Решетников, 1996; Соломко и др., 1997
	Антиандрогенное / тритерпены	Chen, Miles, 1996; Liu, 1999a, b; Liu et al., 2004, 2007
	Обезболивающее / тритерпены, аденозин	Постнова, 2008; Chang, Hayes, 1978; Chen, Miles, 1996;
	Способствует уменьшению приступов эпилепсии	Soo, 1996
	Стимулирует сексуальную потенцию	Stamets, 2000
	Улучшает зрение	Boh, 2002

Имеются сведения (Chang, Miles, 2004) о сильной противоопухолевой активности гетеро- β -D-глюканов, выделенных из плодовых тел и мицелия *G. lucidum*. В опытах Н.В. Кожемякиной и ее коллег (2007) водонерастворимый гликан *G. applanatum* проявил противоопухолевую активность в отношении опухоли Эрлиха.

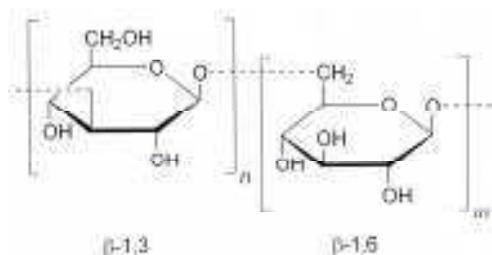


Рис. 1. Схематическое изображение молекулярной структуры β -1-3-, β -1-6-D- глюканов (Moradali et al., 2007)

Было установлено, что добавление в течении пяти недель 5%-го порошка высушенных плодовых тел *G. lucidum* в виде добавки к рациону крыс тормозило формирование и рост микроадемом в 2 раза. В многочисленных публикациях (Chen, Miles, 1996; Wasser, Weis, 1997; Boh et al., 2004; Ziegenbein et al., 2006; Moradali et al., 2007) сообщается, что β -D-полисахариды (протеин-полисахаридная фракция) с участием макрофагов стимулируют иммунную функцию *in vivo* и *in vitro*. Имеются данные о кардиотонических эффектах полисахаридов (Hobbs, 1996), а также об антивирусной, митогенетической и гепатопротекторной активностях (Wasser, Weis 1997).

Глюканы (ганодеран А, В, С, D) проявляют гипогликемическое и гиполипидемическое действие (Hobbs, 1996). Установлена (Chang, Miles, 2004) эффективность гликопротеинов культуральной жидкости *G. lucidum* при головокружениях, а водных экстрактов спор – при миотонии и болезни Вагнера. В литературе (Hobbs, 1996) также сообщает о полисахаридах из плодовых тел и мицелия *G. applanatum in vitro*, которые ускоряют образование клеток селезенки, стимулируют в опытах на мышах антираковую активность против Саркомы 180, а

полисахариды *G. lucidum* стимулируют синтез ДНК клеток селезенки, РНК и ДНК костного мозга мышей. По данным некоторых исследователей (Gao et al., 2002a, b, c; Chang, Miles, 2004) водные экстракты *G. lucidum* также способны ингибировать рост фибросаркомы мышей, метастазы рака легких, до 100% – рост Саркомы 180. Исследования, проведенные на животных и людях, показали гепатопротекторную активность полисахаридной фракции и тритерпеноидов, изолированных из *G. lucidum* (Wasser, Weis, 1997). Установлено (Chen et al., 2007) также стимулирование гуморального и клеточного иммунитета протеогликанов, выделенных из плодового тела *G. lucidum*.

Значительный интерес вызывает открытие рецепторов β -D-глюкана на поверхности белых кровяных клеток (лейкоцитов, моноцитов, макрофагов, лимфоцитов) у животных и людей. Широкое стимулирующее действие β -D-глюканов *G. lucidum* через трансдукцию рецепторов клеточной поверхности в иммунной системе влечет, по мнению многих исследователей (Boh et al., 2004; Chang, Miles, 2004; Wasser et al., 2005; Chen, Seleen, 2007; Fan et al., 2008), освобождение цитокинов и лимфокинов (клеточных медиаторов, таких как IL-1, IL-2, IL-4, IL-6), интерферона и TNF (опухолевый некроз-фактор). Как результат, улучшаются иммунные показатели, а именно усиливается функция Т-клеток и синтез антител. Эти механизмы также активируют противовоспалительное, противоопухолевое, антираковое и антимикробное действие *G. lucidum* (Moradali et al., 2007).

Исследователи (Kim, Kim, 1999; Gerber et al., 2000; Gao et al., 2002a; Wasser, 2005; Li et al., 2008) отмечают наличие более чем 130 высокоокислительных и фармакологически активных тритерпеноидов, изолированных из плодовых тел, мицелия и спор *G. lucidum*. В результате анализа плодовых тел *G. applanatum*, собранных в странах Европы и Азии, было выявлено более 30 биологически активных соединений – стероидные компоненты, тритерпены, ганодеровые кислоты и др. Известно (Boh et al., 2004), что общее количество тритерпеноидов, изолированных из плодовых тел *G. applanatum*, растущих в Европе и Азии, приблизительно одинаковое. Наибольшее количество тритерпеновых кислот выявлено в трубочках карпофоров *G. applanatum*.

ганодермонтриола, ганодермодиола, люцидимола В, ганодеровой кислоты β также была выявлена антииммунодефицитная активность против вируса СПИДа (Wasser, Weis, 1997; Gao, 2002a, b, c; Boh et al., 2004).

Известно (Stamets, 2005), что тритерпены, олеиновая кислота и циклооктасульфат характеризуются антигиперсенсibiliзирующими свойствами и, таким образом, антиаллергическим потенциалом. Ганодерминовая кислота С, вероятно, является самой активной из всех протиаллергических компонентов, по активности за ней идут ганодерминовые кислоты А, D, В, которым свойственна способность ингибировать освобождение гистамина (Boh et al., 2004). Такие тритерпеноиды, как ганодеран А, В, С показали сильный гипогликемический эффект (Chang, Miles, 2004).

Ганодеровые кислоты Mf, В и ганодермовая кислота Т-О угнетают синтез холестерина (Hobbs, 1996; Chang, Miles, 2004). В клинической практике установлена способность тритерпеновой ганодеровой кислоты *G. lucidum* уменьшать уровень триглицеридов и липопротеидов низкой плотности в плазме крови людей на 68–74%, активно угнетать синтез холестерина. Ганодеровая кислота S, по данным некоторых ученых (Stamets, 2000; Boh et al., 2004; Chang, Miles, 2004), вызывает антикоагуляционный эффект. Ганодеровые кислоты R и S, выделенные из мицелия, и ганоспоровая кислота А, изолированная из спор *G. lucidum*, имеют антигепатотоксическую и гепатопротекторную активность (Hobbs, 1996; Boh et al., 2004; Chang, Miles, 2004). Выявлено также протигипертоническое действие ганодеровых кислот В, D, F, H, K, S, Y (Hobbs, 1996). Ганомидин и тритерпеноиды *G. lucidum in vitro* показали широкий спектр антибактериальной активности против грамположительных, грамотрицательных бактерий, *Helicobacter pylori* и вируса иммунодефицита (Wasser, Weis, 1997, 1999a, b). Некоторые тритерпеноиды *G. applanatum* угнетают вирус Эпштейн-Бара. Иммуностимулирующие свойства *G. applanatum* выявлено в опытах с животными (Liu, 1999a, b; Boh et al., 2002). Имеются данные (Russel, Paterson, 2006), что РНК из этого гриба эффективна против вируса клещевого энцефалита мышей.

В составе *G. lucidum* отмечают наличие около 20 стероидов

разной структуры (Chang, Miles, 2004). Как правило, они представлены эргостеролами и холестеролами, которые известны своими антисклеротическими и липидоуменьшающими свойствами. Ганостерон характеризуется антигепатотоксичной активностью (Hobbs, 1996).

В современной, преимущественно восточной медицине используют разные препараты из рода *Ganoderma*, особенно *G. lucidum*, в форме инъекций, капсул, гранул и таблеток (порошков из плодовых тел, мицелия, спор), напитков, настоев, чая, сиропа (экстрактов из плодовых тел, мицелия) (Boh, 2002, 2004). Наиболее популярными являются капсулы с порошком плодовых тел (Chang, Miles, 2004). Однако перспективным считается глубинное культивирование грибов, которое позволяет получить экологически чистое сырье – субстанцию с заданными свойствами в более короткие сроки.

Существуют пока фрагментарные сведения об использовании препаратов из *G. lucidum* вместе с другими лекарственными препаратами. Получены положительные результаты совместного применения полисахаридной фракция *G. lucidum* с разными противоопухолевыми антибиотиками – блеомицином, адриамицином, флуороурацином Сенофи, тиогуанином, метотраксатом, цисплатином и некоторыми синтетическими иммуномодуляторами (Chen, Miles 1996). Комбинирование экстракта *G. lucidum* и глутатион-комплекса оказалось эффективными при лечении гепатита. Экстракт гриба этого вида увеличивал действие таких снодействующих средств, как барбитал и пентобарбитал.

Проблематичным остается вопрос дозировки. Фактически, сегодня нет единого мнения о количественном использовании препаратов из *G. lucidum*. В литературе (Jones, 1990; Willard, 1990; Chang, 1996; Soo, 1996; Boh, 2004; Shah, Shah, 2004) приведены разные дозы употребления порошка из плодовых тел и мицелия этого гриба от 0,25 до 10 г в день. Установлено также, что биологически активные компоненты *G. lucidum* и их экстракты не токсичны даже в высоких дозах (Hobbs, 1996; Wasser, 1997; Chang, 1999; Stamets, 2005).

Несмотря на огромное количество публикаций, посвященных *G. lucidum*, исследования, направленные на изучение

биологической активности вегетативного мицелия и штаммового разнообразия *G. lucidum* и *G. applanatum*, закономерностей роста культур при поверхностном и глубинном культивировании, поиск дешевых экологически чистых субстратов для культивирования, остаются актуальными.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований были чистые культуры 40 штаммов рода *Ganoderma* разного географического происхождения (табл. 2.1), которые хранятся в Коллекции культур шляпочных грибов Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины (ИБК) (Бухало и др., 2011).

Таблица 2.1. **Список исследованных штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum***

Номер п/п	Вид, номер штамма в коллекции ИБК	Источник и год получения культуры
1	2	3
<i>G. applanatum</i>		
1	920	InMi NASB (Беларусь), 1989
2	1701	IFB (Беларусь), 2000
3	1672	НАИ (Израиль), 1997
4	1530	ИБК (Украина), 1997
5	1552	ИБК (Украина), 1997
6	1553	ИБК (Украина), 1997
7	1572	ИБК (Украина), 1997
8	1593	ИБК (Украина), 1997
9	1895	ИБК (Украина), 2006
10	1896	ИБК (Украина), 2006
11	1897	ИБК (Украина), 2006
12	1898	ИБК (Украина), 2006
13	1899	ИБК (Украина), 2006

<i>G. lucidum</i>		
14	921	InMi NASB (Беларусь), 1989
15	1670	HA1 (Израиль), 2000
16	1887	HA1 (Израиль), 2006
17	1888	HA1 (Израиль), 2006
18	1889	HA1 (Израиль), 2006
19	1607	KPDR (КНДР), 1998
20	1608	KPDR (КНДР), 1998
21	1787	WCh (Германия), 2000
22	1788	WCh (Германия), 2000
23	1621	IMB (США), 1998
24	1900	IMB (США), 2002
25	1901	IMB (США), 2000
26	1902	IMB (США), 2001
27	1903	IMB (США), 2001
28	331	ИБК (Украина), 1986
29	1683	ИБК (Украина), 2000
30	1904	ИБК (Украина), 2006
31	1905	ИБК (Украина), 2006
32	1906	ИБК (Украина), 2006
33	1907	ИБК (Украина), 2006
34	1908	ИБК (Украина), 2006
35	1909	ИБК (Украина), 2006
36	1910	ИБК (Украина), 2006
37	1911	ИБК (Украина), 2006
38	1912	ИБК (Украина), 2006
39	1913	ИБК (Украина), 2006
40	922	ССВАС (Чехия), 1985

Примечания. InMi NASB – Ин-т микробиологии НАН Беларуси, Минск; IFB – Ин-т леса НАН Беларуси, Гомель; HA1 – Международный центр спорых растений и грибов, Ин-т эволюции Университета Хайфы, Израиль; ИБК – Коллекция культур шляпочных грибов Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев; KPDR – Ин-т растениеводства, Пхеньян, КНДР; WCh – Компания «Везер-Шампийн-йон», Германия; IMB – International Myco Biologics, Inc., Texas, USA; ССВАС – Коллекция культур базидиомицетов Ин-та микробиологии АН Чехии, Прага.

2.1. Культивирование на питательных средах

Стационарная культура. Опыты проводили в конических колбах объемом 100 мл, количество жидкой среды в колбе составляло 50 мл. Как инокулюм использовали три сусло-агаризованных диска диаметром 7 мм с мицелием 7-суточной культуры каждого штамма, которые были предварительно выращены на СА (агаризованном пивном сусле) при температуре 28 °С.

Стационарное культивирование проводили на жидких средах такого состава:

1) синтетическая среда (А), г/л: глюкоза – 25,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0,02; FeSO_4 – 0,02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,02; вода – 1 л (Litchfield, 1967);

2) глюкозо-аспарагиновая среда (ГА), (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 0,4; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5; вода – 1 л.

Глубинная культура. Эксперименты проводили на лабораторных качалках (80 и 150 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл жидкой среды. Среда инокулировали гомогенизированной биомассой определенного штамма (10% объема) (Соломко, Митропольская, 1994) и инкубировали при температуре 28 ± 2 °С. Глубинное культивирование проводили на жидких средах такого состава:

1) глюкозо-пептон-дрожжевая среда (ГПД), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дрожжевой экстракт – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,25; вода – 1 л;

2) нативная молочная сыворотка производства ОАО «Яготинского маслозавода», массовая часть (%): лактоза – 60; белок – 10; липиды – 2; молочная кислота – 7,85; витамины – 0,15; зола – 7 (Сироватка ..., 2006);

3) нативная крупка (отход производства ОАО «Кремнянского крахмального завода») – 20,0 г; вода – 1 л. Состав нативной крупки, массовая часть (%): крахмал – 76,3; белок – 15,6; липиды – 1,3; эндополисахариды – 5,2; зола – 1,6.

До стерилизации кислотность всех сред доводили до определенных значений pH с помощью растворов 1 н. КОН и 1 н. HCl. Синтезованную биомассу отфильтровывали через капро-

новые фильтры и дважды промывали дистиллированной водой. Массу биомассы рассчитывали весовым методом (Методы ..., 1982) по абсолютно сухому веществу после высушивания при температуре 105 ± 1 °С до постоянного веса. В конце культивирования в культуральной жидкости измеряли значения рН.

2.2. Влияние источников питания и физико-химических факторов на рост культур

Влияние источников углерода и азота на рост штаммов исследовали на глюкозо-аспарагиновой (ГА) среде (рН 5,5). Вместо глюкозы как источника углерода в питательную среду вносили лактозу, сахарозу или крахмал в количестве, эквивалентном глюкозе в перерасчете на углерод. Вместо аспарагина как источника азота в питательную среду добавляли NaNO_3 или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве, эквивалентном аспарагину в перерасчете на азот. Рассматривая аспарагин как возможный источник углерода, дополнительно изучали рост культур на ГА среде без внесения глюкозы. Контролем был рост культур на выбранной среде без глюкозы и аспарагина.

Исследования роста культур при разных значениях концентрации ионов водорода (рН) проводили в 100 мл конических колбах с 50 мл синтетической среды с глюкозой.

До стерилизации кислотность среды до разных значений рН доводили с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH . После стерилизации рН среды составляло 3,2; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 и 7,3. Инокулированные тремя сусло-агаризованными дисками мицелия (диаметром 7 мм) колбы со средой с вышеупомянутыми рН инкубировали поверхностно при температуре 28 ± 2 °С в течение 29 суток.

Рост и морфологию культур изучали на СА: пивное сусло (сахаристость 8° по Балингу) – 1 л, агар-агар – 20 г. Влияние температуры на рост и морфолого-культуральные особенности колоний культур исследовали при температурах: 5, 12, 20, 28, 32 ± 1 °С в течение 30 суток.

В процессе роста каждые двое суток измеряли радиус колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях с целью определения скорости радиального роста (V_r , мм/сут) по формуле:

$$Vr = \frac{a-b}{t},$$

где a – радиус колонии в конце линейного роста, мм; b – радиус колонии в начале линейного роста, мм; t – длительность (количество суток) линейного роста (Соломко, 2000).

Морфолого-культуральные особенности колоний описывали при температурах 20, 28 и 32 °С после полного обрастания мицелием гриба питательной среды в чашке Петри на определенные для каждого штамма сутки. Культуральные характеристики сопоставляли с известными ключами (Nobles, 1965; Stalpers, 1978).

2.3. Биосинтетическая активность культур

2.3.1. Антимикробная активность культур

Для проведения экспериментов по исследованию антимикробной активности штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* использовали 14 тест-культур из Всероссийской Коллекции микроорганизмов (ВКМ): *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *B. pumilis* NCTC 8241, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, INA 00761, INA 00762, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ATCC 8461, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aspergillus niger* INA 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259, *Candida albicans* INA 00763.

Штаммы *G. applanatum* и *G. lucidum* культивировали в колбах с отбойниками объемом 500 мл (объем среды 100 мл) на качалке (80 об/мин) при температуре 28 °С на среде ГПД (рН 5,5). В колбу вносили инокулюм – семь сусло-агаризованных дисков диаметром 7 мм с мицелием 7-суточной культуры. На 14-е и 21-е сутки роста из каждой колбы стерильно отбирали образцы (5 мл) культуральной жидкости с мелкодисперсной биомассой, которую сразу замораживали.

Антимикробную активность размороженных проб и их экстрактов определяли методом дисков (Методы ..., 1982). Для получения экстрактов в пробы вносили ½ объема этилацетата, перемешивали в теченик часа и оставляли на сутки при

температуре 4 °С. Этилацетатную фракцию отделяли и упаривали досуха. К остатку добавляли 10% водного метанола в количестве 1/10 начального объема пробы. После 10-кратной концентрации пробы ее антибиотическую активность определяли в отношении к трем грамположительным штаммам бактерий: *Staphylococcus aureus* INA 00761 (метициллинстойкий) – стойкий к 32 мкг/мл оксациллина, *S. aureus* INA 00762 (метициллин-чувствительный) – стойкий к 0,125 мкг/мл оксациллина, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, а также в отношении к мицелиального гриба *Aspergillus niger* INA 00760.

2.3.2. Антивирусная активность культур

Исследовали действие культуральной жидкости 7 штаммов *G. applanatum* (920, 1552, 1530, 1553, 1672, 1701, 1899) и 7 штаммов *G. lucidum* (922, 1608, 1621, 1788, 1887, 1900, 1908) против вируса табачной мозаики (ВТМ) штамм U₁ из коллекции отдела вирусологии Ин-та микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Грибы выращивали в глубинной культуре на качалке (150 об/мин) в течение 14 сут при 28 °С на синтетической среде А с глюкозой. После отфильтровывания биомассы культуральную жидкость лиофилизировали.

Водные растворы лиофилизированной культуральной жидкости в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл добавляли к суспензии ВТМ (10 мкг/мл). Через 30 мин инкубации смесью инокулировали левые половинки листов дурмана (*Datura stramonium* L.), которые росли в теплице при естественном освещении, влажности и температуре. Правые, контрольные половинки, инокулировали ВТМ в той же концентрации, но без добавления культуральной жидкости. В опыте были задействованы растения в возрасте 4–6 листочков. Степень подавления вирусной инфекции (в процентах) определяли по количеству некрозов на опытной и контрольной половинках листов по формуле (Коваленко, 1983):

$$I = \frac{K - D}{K} 100 \%,$$

где I – степень ингибирования вируса, %; K – количество некрозов в контроле; D – в опыте.

2.3.3. Антиоксидантная активность культур

Культуры для выявления антиоксидантной активности (АОА) культивировали при температуре 28 ± 2 °C поверхностно в колбах Эрленмейера на среде ГПД (рН 5,5). Влияние длительности культивирования на величину АОА изучали на примере двух штаммов *G. lucidum* (1621 и 1903). Значения АОА определяли в биомассе и культуральной жидкости на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки. Метод выявления АОА основывается на исследовании кинетики окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха при наличии и отсутствии биологического материала и расчета величины константы ингибирования биологическим материалом окисления 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия как показателя антиоксидантной активности биологического материала (Семенов, 1985). Этот показатель рассчитывают по формуле:

$$K_i = \frac{K_{\text{конт}} - K_{\text{опыт}}}{C},$$

где $K_{\text{конт}}$ и $K_{\text{опыт}}$ – константы скорости окисления субстрата в контроле и опыте соответственно; C – концентрация биологического материала в кювете.

Значения константы скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия в контроле и опыте определяли при помощи графика зависимости натуральных логарифмов ΔD_t от времени. ΔD_t – разница между оптической плотностью реакционной смеси, в которой 2,6-дихлорфенолиндофенол натрия полностью окисляется до опытного или контрольного раствора.

Оптическую плотность измеряли 5 мин на фотоэлектроколориметре при длине волны 510 нм через каждые 30 сек.

2.4. Рост культур и синтез экзополисахаридов при глубинном культивировании

Количество синтезированной биомассы и содержание экзополисахаридов определенных штаммов (*G. applanatum* 1572 и *G. lucidum* 1621) устанавливали в динамике один раз в двое

суток в течение 19 сут глубинного культивирования на нативной молочной сыворотке и на нативной крупке. Экзополисахариды определяли в культуральной жидкости согласно описанной методике (Babitskaya, 2000). Для выделения экзополисахаридов культуральную жидкость упаривали дважды, осаждали этиловым спиртом (1:1) и при температуре 4 °С оставляли до полного осаждения. Затем осажденные полисахариды отделяли центрифугированием, диализировали 3 сут, переосаждали спиртом, отделяли центрифугированием и сушили в лиофильной сушке до постоянного веса.

2.5. Статистическая обработка результатов

Повторность проведенных опытов – 3- и 5-кратная. Результаты, полученные при сравнительном изучении штаммов, обработаны статистическими методами анализа, вычислены значения средних квадратических отклонений, коэффициентов вариации, доверительных интервалов с помощью компьютерных пакетов Microsoft office Excell и StatSoft Statistika 6.0. В таблицах и рисунках представлены средние статистически достоверные данные при 95%-й вероятности.

3. ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ ПИТАНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ КУЛЬТУР

Возможность многопланового использования видов рода *Ganoderma* в современной медицине и фармакологии в лечебно-профилактических целях обуславливает необходимость изучения в культуре особенностей их питания, физиологии, физико-химических параметров роста для получения ценной биомассы и метаболитов.

3.1. Влияние источников углерода и азота на рост культур

Дереворазрушающие грибы образуют важную физиолого-экологическую группу грибов ксилотрофов, ферментативная

система которых способна активно разлагать лигноцеллюлозный комплекс разнообразных растительных субстратов. По данным исследователей (Бухало, 1988; Соломко, 1992), известно, что высшие базидиальные грибы хорошо растут в культуре, используя соединения углерода и азота разной химической природы.

Установлено, что 9 из 27 штаммов *G. lucidum* и только один из 13 штаммов *G. applanatum* способны накапливать одинаковое количество биомассы на средах со всеми использованными в работе источниками углерода (табл. 3.1, 3.2). Некоторые исследованные штаммы отдавали предпочтение только одному определенному источнику углерода. Так, крахмал был лучшим источником для роста 15,4% штаммов *G. applanatum* и 14,8% штаммов *G. lucidum*. Наличие в питательной среде глюкозы способствовало синтезу максимального количества биомассы трех штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum*. Лучшей для роста *G. lucidum* 1608 и 1907 оказалась сахароза.

Определенные культуры хорошо росли на средах с тремя из четырех использованных источников углерода. Так, 14,8% штаммов *G. lucidum* с одинаковым уровнем утилизировали глюкозу, лактозу, сахарозу. Аналогичная закономерность роста отмечена при использовании глюкозы, сахарозы или крахмала для 23,1% штаммов *G. applanatum*.

Некоторые штаммы синтезировали одинаковое количество биомассы при наличии моно- или полисахарида в питательной среде. Это было характерно для трех штаммов *G. applanatum* и трех штаммов *G. lucidum*, которые хорошо росли на глюкозе и крахмале. Такой же характер роста выявлен для ряда штаммов на питательной среде с ди- или полисахаридом. Сахароза и крахмал способствовали интенсивному росту *G. applanatum* 1897, *G. lucidum* 1607, лактоза и крахмал – *G. lucidum* 1888, 1906. Используемые в работе дисахариды (лактоза и сахароза) для

определенных культур были взаимозаменяемыми. Так, для 38,5% штаммов *G. applanatum* и 55,5% *G. lucidum* количество синтезированной биомассы на лактозе и сахарозе не отличалось (табл. 3.1, 3.2). Можно предположить, что хороший рост культур на ГА среде может быть обусловлен наличием в составе аспарагина как атомов углерода, так и азота.

Таблица 3.1. Биомасса (г/л) и значения pH культуральной жидкости штаммов *Ganoderma applanatum* на средах с разными источниками углерода

Штамм	Контроль	Исходное значение pH среды	Источники углерода и конечные значения pH культуральной жидкости							
			Глюкоза	pH	Лактоза	pH	Сахароза	pH	Крахмал	pH
920	0,4±0,1	5,5	4,6±0,1	3,8	1,2±0,2*	4,6	3,4±0,2*	3,7	2,6±0,2*	3,6
1701	0,4±0,0	5,5	3,8±0,8	4,7	1,8±0,2*	4,3	3,7±0,1	4,2	3,6±0,4	4,2
1672	0,3±0,1	5,5	3,5±0,3	4,3	1,2±0,1*	5,2	1,4±0,3*	5,1	3,1±0,4	3,9
1530	0,3±0,2	5,5	3,6±0,2	4,0	1,3±0,1*	4,5	3,3±0,3	4,2	3,3±0,1	3,9
1552	0,3±0,2	5,5	2,9±0,8	4,0	1,0±0,1*	4,6	1,3±0,3*	4,2	3,7±0,2	3,7
1553	0,3±0,1	5,5	3,4±0,3	3,2	1,7±0,3*	3,7	3,4±0,4	3,7	3,6±0,5	3,3
1572	0,3±0,1	5,5	4,0±0,3	4,4	3,6±0,2	3,6	4,3±0,4	4,2	4,0±0,0	3,4
1593	0,4±0,2	5,5	4,7±0,6	5,3	1,0±0,0*	4,1	0,8±0,0*	4,6	2,8±0,6*	3,4
1895	0,2±0,1	5,5	1,3±0,1	3,8	1,3±0,1	4,7	1,3±0,1	4,3	3,4±0,2*	4,0
1896	0,3±0,1	5,5	3,6±0,2	4,6	2,0±0,4*	4,4	2,3±0,2*	5,1	1,8±0,0*	5,4
1897	0,2±0,1	5,5	1,0±0,0	5,5	0,9±0,1	4,5	1,7±0,2*	5,4	1,8±0,1*	5,4
1898	0,2±0,0	5,5	2,1±0,1	5,3	1,3±0,7*	4,5	1,4±0,1*	4,4	2,0±0,2	5,4
1899	0,3±0,0	5,5	2,6±0,6	4,2	0,9±0,4*	5,0	2,7±0,6	4,3	4,0±0,2*	4,0

Примечания. Здесь и в табл. 3.2: "*" – величина достоверно отличается от биомассы на средах с глюкозой ($p \geq 0,95$); контроль – количество синтезованной биомассы на минеральной среде без глюкозы и аспарагина; жирным шрифтом выделено максимальное количество биомассы.

Таблица 3.2. Биомасса (г/л) и значения pH культуральной жидкости штаммов *Ganoderma lucidum* на средах с разными источниками углерода

Штамм	Контроль	Исходное значение pH среды	Источники углерода и конечные значения pH культуральной жидкости							
			Глюкоза	pH	Лактоза	pH	Сахароза	pH	Крахмал	pH
921	0,1±0,1	5,5	0,4±0,0	5,2	0,7±0,2	5,0	0,5±0,1	5,4	0,5±0,1	5,4
1670	0,2±0,1	5,5	3,3±0,3	3,4	2,6±0,1*	3,3	2,1±0,7*	4,2	2,9±0,1	3,6
1887	0,3±0,0	5,5	1,2±0,1	5,5	2,3±0,1*	4,3	1,7±0,3	4,7	1,7±0,1*	4,4
1888	0,2±0,1	5,5	1,9±0,2	3,8	3,3±0,1*	3,6	1,8±0,3	6,0	3,3±0,3*	3,4
1889	0,2±0,0	5,5	1,2±0,2	3,3	0,8±0,0*	3,3	0,9±0,1*	3,2	2,4±0,3*	3,4
1607	0,1±0,0	5,5	1,2±0,2	3,2	1,1±0,1	4,0	1,6±0,1*	3,6	1,7±0,1*	3,6
1608	0,1±0,2	5,5	0,6±0,1	4,3	2,1±0,2*	3,9	2,5±0,1*	4,1	1,8±0,3*	3,6
1787	0,2±0,1	5,5	1,6±0,4	3,2	1,0±0,0*	3,1	0,7±0,1*	3,2	2,1±0,0	3,2
1788	0,4±0,2	5,5	3,0±0,5	4,0	1,4±0,1*	4,0	0,6±0,0*	5,8	1,8±0,1*	4,0
1621	0,3±0,1	5,5	2,9±0,4	4,0	3,7±0,4	3,4	2,8±0,4	4,4	3,2±0,1	3,4
1900	0,2±0,1	5,5	2,1±0,4	3,6	2,2±0,2	3,4	1,7±0,3	3,2	2,3±0,2	3,4
1901	0,2±0,1	5,5	0,8±0,1	4,0	0,7±0,1	4,1	0,7±0,1	4,1	1,0±0,1	4,4
1902	0,3±0,1	5,5	2,2±0,1	3,6	2,5±0,5	3,6	1,8±0,1*	3,6	2,3±0,3	3,6
1903	0,3±0,2	5,5	1,4±0,1	3,6	0,9±0,1*	3,9	0,6±0,2*	5,6	1,0±0,1*	3,8

Окончание табл. 3.2

331	0,1±0,0	5,5	2,3±0,3	3,4	1,5±0,3*	3,4	1,5±0,3*	4,2	2,2±0,5	3,4
1683	0,1±0,0	5,5	1,1±0,2*	4,2	0,9±0,1	4,7	1,1±0,2	4,7	2,3±0,2*	3,4
1904	0,2±0,1	5,5	2,0±0,0	4,8	0,9±0,1*	3,9	0,6±0,2*	5,6	1,0±0,1*	3,8
1905	0,1±0,0	5,5	0,7±0,1	4,4	0,5±0,2	3,4	0,4±0,2*	3,5	1,3±0,2*	4,7
1906	0,2±0,0	5,5	1,5±0,3	3,6	2,1±0,1	3,8	0,9±0,2*	3,8	2,4±0,3*	3,8
1907	0,2±0,1	5,5	1,2±0,2	4,1	1,0±0,0	4,2	2,6±0,2*	4,2	1,5±0,3	4,1
1908	0,4±0,2	5,5	1,7±0,3	4,2	1,6±0,6	3,7	1,8±0,1	3,6	1,6±0,2	3,7
1909	0,2±0,1	5,5	1,1±0,1	4,5	1,8±0,6	4,6	0,7±0,1*	4,6	1,5±0,3	4,6
1910	0,1±0,0	5,5	0,6±0,0	4,0	1,0±0,4	3,7	0,6±0,2	3,7	0,7±0,1	3,7
1911	0,2±0,0	5,5	1,3±0,1	4,4	1,5±0,1	4,4	1,4±0,0	4,6	1,4±0,1	4,6
1912	0,3±0,1	5,5	1,3±0,1	4,2	1,5±0,5	4,4	1,2±0,0	6,3	1,1±0,3	4,6
1913	0,4±0,0	5,5	1,9±0,1	3,2	2,1±0,1	3,6	1,8±0,1	3,8	2,2±0,2	3,6
922	0,2±0,1	5,5	1,6±0,2	3,1	1,3±0,0	3,3	1,3±0,0	4,8	2,7±0,4*	2,9

Установлено, что на питательной среде с аспарагином (без внесения глюкозы) неплохо росли только *G. lucidum* 1788 и 1904 (их синтезованная биомасса 0,6 и 0,7 г/л соответственно) и *G. applanatum* 920, 1896, 1899 (синтезованная биомасса последнего 0,7 г/л, остальных – 1,0 г/л). Другие штаммы на такой среде накапливали только 0,2–0,4 г/л. Таким образом, при использовании ГА среды аспарагин (внесение которого составило 0,4 г/л) имеет совсем небольшое значение как источник углерода для исследованных нами штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum*.

По степени благоприятности для роста большинства культур *G. applanatum* разные источники углерода можно разместить в следующий ряд: глюкоза = крахмал > сахароза > лактоза, для большинства штаммов *G. lucidum* этот ряд выглядит таким образом: крахмал > глюкоза > лактоза > сахароза. Способность штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* эффективно использовать разные источники углерода связана со спецификой индукции адаптивных ферментных систем в культурах разного происхождения.

Из литературы (Бисько, 1988; Бухало, 1988; Wasser et al., 2003; Elisashvili et al., 2004) известно о разном влиянии источников азота на биосинтез биомассы штаммами одного вида. Полученные нами данные также свидетельствуют о неодинаковом отношении исследованных штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum* к источникам азота разной природы (табл. 3.3, 3.4). Следует отметить, что 6 штаммов *G. lucidum* и только штамм *G. applanatum* 1897 одинаково росли на среде с органическим (аспарагин) и минеральными (амонийным и нитратным) источниками азота. Среди всех исследованных культур выделился штамм *G. applanatum* 1896, биомасса инокулюма которого не увеличивалась в течение культивирования на питательной среде с нитратом натрия (табл. 3.3).

Одинаково хорошо росли, используя органический и минеральный источники азота, 46,1% штаммов *G. applanatum* и 70,4% штаммов *G. lucidum*. Большинство штаммов *G. lucidum* (29,6%) и 3 штамма *G. applanatum* (23,0%) накапливали максимальное количество биомассы при наличии в среде аспарагина или сульфата аммония.

Таблица 3.3. Биомасса (г/л) и значения pH культуральной жидкости штаммов *Ganoderma applanatum* на средах с разными источниками азота

Штамм	Контроль	Исходное значение pH среды	Источники азота и конечные значения pH культуральной жидкости					
			Аспарагин	pH	Сульфат аммония	pH	Нитрат натрия	pH
920	0,4±0,1	5,5	4,6±0,1	3,8	2,0±0,4*	3,5	1,5±0,3*	4,2
1701	0,4±0,0	5,5	3,8±0,8	4,7	4,7±0,4	3,5	2,5±0,4*	5,3
1672	0,3±0,1	5,5	3,5±0,3	4,3	3,1±0,4	3,4	1,5±0,2*	4,4
1530	0,3±0,2	5,5	3,6±0,2*	4,0	2,4±0,2	3,7	2,3±0,6	5,5
1552	0,3±0,2	5,5	2,9±0,8	4,0	1,8±0,2	3,7	1,2±0,1*	4,0
1553	0,3±0,1	5,5	3,4±0,3*	3,2	1,0±0,1	3,2	1,2±0,3	4,6
1572	0,3±0,1	5,5	4,0±0,3*	4,4	2,2±0,1	3,7	4,0±0,2*	4,8
1593	0,4±0,2	5,5	4,7±0,6*	5,3	2,2±0,2	3,8	1,9±0,4	5,5
1895	0,2±0,1	5,5	1,3±0,1*	3,8	0,9±0,1	3,8	1,1±0,3	5,5
1896	0,3±0,1	5,5	3,6±0,2	4,6	1,8±0,0	3,5	0,4±0,0*	3,8
1897	0,2±0,1	5,5	1,0±0,0	5,5	0,7±0,1	4,2	0,8±0,1	5,4
1898	0,2±0,0	5,5	2,1±0,1*	5,3	1,4±0,1	3,4	0,5±0,1*	5,0
1899	0,3±0,0	5,5	2,6±0,6*	4,2	2,5±0,4	3,8	1,2±0,4*	4,9

Примечание. "*" – Величина достоверно отличается от биомассы на среде с сульфатом аммония ($p \geq 0,95$); контроль – рост культур на минеральной среде без глюкозы и аспарагина; жирным шрифтом выделено максимальное количество биомассы.

Таблица 3.4. Биомасса (г/л) и значения рН культуральной жидкости штаммов *Ganoderma lucidum* на средах с разными источниками азота

Штамм	Контроль	Исходное значение рН среды	Источники азота и конечные значения рН культуральной жидкости					
			Аспарагин	рН	Сульфат аммония	рН	Нитрат натрия	рН
1	2	3	4	5	6	7	8	9
921	0,1±0,0	5,5	0,4±0,0	5,2	0,4±0,1	4,7	0,4±0,0	5,4
1670	0,2±0,1	5,5	3,3±0,3*	3,4	2,0±0,0	3,2	1,5±0,5	3,8
1887	0,3±0,0	5,5	1,2±0,1	5,5	1,3±0,1	3,9	1,6±0,0*	3,7
1888	0,2±0,1	5,5	1,9±0,2	3,8	1,7±0,1	3,2	1,8±0,1	4,2
1889	0,2±0,0	5,5	1,2±0,2	3,3	1,4±0,1	3,3	1,6±0,2	3,5
1607	0,1±0,0	5,5	1,2±0,2*	3,2	0,6±0,1	3,2	0,5±0,1	5,0
1608	0,1±0,2	5,5	0,6±0,1	4,3	0,6±0,2	3,5	0,6±0,1	4,8
1787	0,2±0,1	5,5	1,6±0,4*	3,2	0,7±0,1	2,9	1,3±0,3*	5,2
1788	0,4±0,2	5,5	3,0±0,5*	4,0	1,0±0,2	3,4	1,0±0,4	5,0
1621	0,3±0,1	5,5	2,9±0,4	4,0	2,3±0,4	3,3	1,1±0,5*	4,5
1900	0,2±0,1	5,5	2,1±0,4*	3,6	1,1±0,2	3,4	1,0±0,6	4,0
1901	0,2±0,1	5,5	0,8±0,1	4,0	1,0±0,1	3,7	1,1±0,3	5,2
1902	0,3±0,1	5,5	2,2±0,1	3,6	2,3±0,3	3,3	1,3±0,1*	4,0
1903	0,3±0,2	5,5	1,4±0,1*	3,6	2,1±0,3	3,2	1,2±0,1*	4,0

Окончание табл. 3.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
331	0,1±0,0	5,5	2,3±0,3*	3,4	1,3±0,1	3,1	0,6±0,0*	4,2
1683	0,1±0,0	5,5	1,1±0,2*	4,2	0,6±0,0	3,4	1,0±0,1*	4,3
1904	0,2±0,1	5,5	2,0±0,0*	4,8	1,0±0,2	3,6	1,2±0,2	5,2
1905	0,1±0,0	5,5	0,7±0,1	4,4	0,5±0,1	3,4	0,4±0,0	5,2
1906	0,2±0,0	5,5	1,5±0,3	3,6	1,1±0,1	3,6	0,7±0,3	3,8
1907	0,2±0,1	5,5	1,2±0,2	4,1	1,2±0,0	3,4	0,7±0,1*	4,1
1908	0,4±0,2	5,5	1,7±0,3	4,2	1,8±0,0	3,5	1,3±0,1*	4,2
1909	0,2±0,1	5,5	1,1±0,1	4,5	1,1±0,1	3,8	0,5±0,1*	5,5
1910	0,1±0,0	5,5	0,6±0,0	4,0	0,4±0,0	3,7	0,5±0,1	5,2
1911	0,2±0,0	5,5	1,3±0,1	4,4	1,3±0,1	3,8	0,8±0,1*	5,2
1912	0,3±0,1	5,5	1,3±0,1	4,2	2,1±0,9	3,2	0,9±0,1*	4,9
1913	0,4±0,0	5,5	1,9±0,1	3,2	2,0±0,0	2,8	1,4±0,2*	4,4
922	0,2±0,1	5,5	1,6±0,2*	3,1	1,1±0,1	3,1	1,6±0,3*	3,3

Примечание. * – Величина достоверно отличается от биомассы на среде с сульфатом аммония ($p \geq 0,95$); контроль – рост культур на глюкозо-аспарагиновой среде без глюкозы и аспарагина; жирным шрифтом выделено максимальное количество биомассы.

Присутствие в питательной среде аспарагина или нитрата натрия обеспечивало лучший рост семи штаммов *G. lucidum* и двух штаммов *G. applanatum*.

Использованные в работе источники минерального азота для отдельных культур были взаимозаменяемыми. Так, для 46,1% штаммов *G. applanatum* и 70,4% *G. lucidum* количества синтезированной биомассы на средах с сульфатом аммония и нитратом натрия не отличались (табл. 3.1, 3.2).

Некоторые штаммы обоих исследованных видов отдавали предпочтение определенному источнику азота. В нашем эксперименте 7 штаммов *G. applanatum* и 6 штаммов *G. lucidum* лучше росли при наличии в составе среды аспарагина. Существует мнение (Fang, Zhong, 2002), что хорошее усвоение органического азота обусловлено неспособностью синтеза необходимо важных для роста *G. lucidum* аминокислот из источников неорганического азота.

Замена аспарагина на соли аммония способствовала интенсивному биосинтезу биомассы только одним штаммом *G. lucidum* – 1903. Лучше накапливал биомассу на среде с нитратным азотом штамм *G. lucidum* 1887. Как правило, высшие базидиальные грибы плохо усваивают азот в форме нитратов (Бухало, 1988).

По степени благоприятности для роста большинства штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum* использованные источники азота можно разместить в следующий ряд: аспарагин > сульфат аммония > нитрат натрия. Штаммы *G. lucidum* и *G. applanatum* по критерию использования источников азота относятся ко второму классу, который характеризуется возможностью усваивать органический, амиачный и нитратный азот (Chang, Miles, 2004).

Измерения величины pH среды в конце культивирования показали, что для штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* pH культуральной среды с сульфатом аммония всегда изменялось в сторону подкисления. В то же время, при наличии в среде аспарагина или нитрата натрия значение кислотности иногда оставалось на исходном уровне (5,5) или немного уменьшалось (табл. 3.1, 3.2), что было замечено при слабом росте культур.

При измерении уровня кислотности среды в конце

культивирования в опытах с разными источниками углерода установлено, что у всех штаммов *G. applanatum* pH культуральной среды уменьшалось, за исключением роста штамма 1897 на среде с глюкозой. Концентрация ионов водорода культуральной жидкости штаммов *G. lucidum* также изменялась в сторону подкисления, кроме штамма *G. lucidum* 1887 с неизменяемым уровнем pH культуральной жидкости при культивировании на среде с глюкозой и четырех штаммов *G. lucidum*, которые при наличии в среде сахарозы увеличили исходный уровень кислотности культуральной жидкости (табл. 3.1, 3.2).

Таким образом, установлены определенные отличия между исследуемыми штаммами *G. applanatum* и *G. lucidum* по критерию накопления биомассы на средах с разными источниками углеродного и азотного питания. Все исследованные культуры способны расти с разной интенсивностью на использованных в работе источниках углерода и азота, кроме штамма *G. applanatum* 1896. По способности роста на разных источниках углерода и азота 10 штаммов *G. applanatum* и 12 штаммов *G. lucidum*, выделенные из плодовых тел грибов, собранных на территории Украины, не отличались от культур разного происхождения из Коллекции культур шляпочных грибов (ИБК).

Использование дисперсионного анализа двухфакторного опыта позволило установить влияние источников питания, биологических особенностей штаммов или их взаимодействие на биосинтез биомассы. Так, для *G. applanatum* было характерным почти одинаковое влияние источника углерода (32,9%) и взаимодействие влияния биологических особенностей штамма и источника углерода (31,8%), небольшой процент составили биологические особенности штамма (34,0%). Для *G. lucidum* выявлено доминирующее действие биологических особенностей штаммов, что составило 61%.

В проведенных экспериментах по росту исследованных культур обоих видов на разных источниках азота выявлено преобладающее влияние биологических особенностей штаммов на накопление биомассы *G. applanatum* и *G. lucidum* – 68,9% и 52,4% соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что штаммы

G. applanatum 1572 и *G. lucidum* 1621, синтезирующие наибольшую биомассу на средах с лактозой и крахмалом, могут быть перспективными продуцентами при культивировании на дешевых отходах производства молочной продукции и переработки картофеля.

3.2. Влияние кислотности питательной среды на образование биомассы

Установлено (Билай, 1989), что кардинальные (минимальные, максимальные) значения и оптимум кислотности для роста и спороношения грибов зависят от условий культивирования, в частности от состава питательной среды, температуры, аэрации. Большинство видов грибов по имеющимся данным (Шиврина, 1969; Бухало, 1988) растут при разных значениях кислотности, однако оптимальными для роста мицелия высших базидиомицетов считается диапазон pH 5,0-6,0.

При поверхностном культивировании большинство культур *G. applanatum* (61,5%) и *G. lucidum* (51,9%) росли на жидкой питательной среде с глюкозой при pH от 3,2–7,3 (табл. 3.5). У 23,1% штаммов *G. applanatum* и 37,0% штаммов *G. lucidum* рост культур наблюдали при pH от 4,0–7,3. Остальные исследованные штаммы обоих видов имели более узкий диапазон роста.

Поверхность пленки мицелия всех исследованных культур была белой, плотной, плоской, реверзум желтоватый.

Максимальное количество биомассы на синтетической среде накапливали исследованные штаммы *G. applanatum* и *G. lucidum* при pH от 4,0–6,5 (рис. 3.1). Это обусловлено физиологическими особенностями каждого штамма. Для большинства штаммов оптимальными для синтеза биомассы были значения pH 5,0 и 5,5, что совпадает с данными литературы (Stamets, 2005). При наиболее благоприятных для активного роста значений pH на 14-е сутки культивирования в стационарных условиях выход биомассы штаммов *G. applanatum* составил 5,2–13,4 г/л, *G. lucidum* – от 1,9 до 9,0 г/л.

Таблица 3.5. Биомасса (г/л*) штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum* при разном значении pH среды

Штамм	Значение pH								
	3,2	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,3
<i>G. applanatum</i>									
920	1,4±0,6	8,0±0,2	9,9±0,4	12,0±0,1	8,5±0,7	6,0±0,5	4,2±0,0	2,8±0,5	2,0±0,4
1701	1,4±0,1	10,2±0,3	10,6±0,4	13,5±0,1	13,0±0,4	12,4±0,5	5,0±0,6	3,6±0,5	0,6±0,3
1672	3,8±0,5	7,1±0,2	7,3±0,5	11,2±0,4	10,2±0,3	9,7±0,6	8,5±0,3	8,5±0,5	6,8±0,6
1530	3,0±0,8	6,0±0,4	8,8±0,7	11,0±0,8	8,2±0,6	7,6±0,2	7,0±0,7	5,2±0,2	4,2±0,6
1552	0,8±0,3	5,4±0,5	7,8±0,3	8,0±0,6	10,3±0,6	12,0±0,0	13,4±0,4	11,6±0,5	7,2±0,6
1553	1,8±0,3	12,8±0,6	11,8±0,2	11,0±0,3	10,0±0,3	7,6±0,2	6,4±0,4	4,9±0,0	-
1572	1,8±0,4	6,3±0,5	7,3±0,2	7,8±0,4	7,8±0,3	6,6±0,1	5,8±0,0	4,3±0,2	1,2±0,3
1593	1,6±0,5	8,6±0,9	7,9±0,3	10,2±0,2	10,2±0,3	8,8±0,0	8,8±0,0	5,4±0,1	1,4±0,5
1895	-	8,6±0,5	8,6±0,6	6,6±0,4	4,5±0,5	4,4±0,6	4,3±0,9	3,0±0,2	2,6±0,1
1896	-	1,6±0,9	2,6±0,4	3,6±0,0	4,6±0,1	6,7±0,2	3,4±0,0	3,2±0,0	2,6±0,3
1897	-	0,5±0,3	0,7±0,1	0,8±0,1	5,6±0,0	4,6±0,7	3,9±0,1	3,9±0,3	3,4±0,4
1898	-	-	0,6±0,2	0,8±0,2	3,6±0,2	4,0±0,3	5,2±0,4	2,4±0,5	-
1899	0,8±0,4	9,1±0,3	10,8±0,7	12,8±0,1	13,4±0,1	12,6±0,2	8,8±0,2	8,6±0,4	8,4±0,2

<i>G. lucidum</i>									
921	-	1,9±0,4	2,5±0,3	3,2±0,6	4,0±0,5	2,6±0,7	0,8±0,5	0,7±0,5	-
1670	-	0,8±0,2	1,5±0,1	2,7±0,3	4,3±0,4	5,7±0,6	2,7±0,1	0,9±0,2	0,8±0,0
1887	0,8±0,6	4,4±0,0	5,4±0,6	5,4±0,5	5,4±0,4	4,6±0,4	1,8±0,0	1,0±0,4	0,8±0,6
1888	-	1,4±0,4	1,6±0,0	1,8±0,1	2,9±0,0	1,8±0,0	1,4±0,0	1,3±0,3	1,2±0,4
1889	-	-	0,9±0,4	1,9±0,1	1,9±0,1	0,5±0,2	-	-	-
1607	-	4,2±0,8	4,6±0,6	5,5±0,7	5,6±0,5	6,0±0,6	5,0±0,1	4,0±0,3	3,0±0,2
1608	2,6±0,7	6,8±0,0	6,2±0,7	5,2±0,2	4,6±0,1	4,2±0,5	2,7±0,2	1,7±0,3	1,0±0,5
1787	0,6±0,4	1,0±0,3	2,3±0,5	3,8±0,2	3,5±0,3	3,2±0,2	2,6±0,5	1,6±0,4	0,7±0,2
1788	-	1,8±0,6	3,6±0,4	4,6±0,5	6,8±0,6	6,2±0,3	5,4±0,7	3,8±0,2	2,6±0,4
1621	3,6±0,6	4,8±0,4	5,4±0,1	6,8±0,2	7,2±0,3	8,7±0,5	8,1±0,1	6,5±0,7	3,8±0,1
1900	-	6,0±0,5	6,0±0,4	6,0±0,5	3,8±0,3	2,2±0,3	2,0±0,1	1,2±0,1	1,0±0,2
1901	-	2,2±0,3	2,7±0,5	3,0±0,3	4,0±0,5	2,9±0,2	2,6±0,7	1,6±0,3	1,6±0,4
1902	-	1,1±0,3	2,0±0,3	2,8±0,6	3,2±0,8	4,1±0,1	4,0±0,1	2,6±0,4	-
1903	-	4,2±0,2	4,1±0,1	3,6±0,5	3,6±0,1	3,4±0,6	3,4±0,0	3,0±0,3	1,0±0,3
331	-	1,3±0,2	1,6±0,2	2,3±0,3	2,8±0,2	3,3±0,4	6,2±0,2	5,8±0,4	2,8±0,2
1683	-	2,6±0,4	2,8±0,2	4,6±0,2	3,5±0,1	3,1±0,4	2,8±0,1	1,4±0,2	1,4±0,1
1904	1,5±0,3	4,2±0,1	4,4±0,0	4,8±0,0	9,0±0,4	7,4±0,5	6,7±0,2	3,4±0,4	2,8±0,3
1905	2,0±0,2	3,8±0,1	3,9±0,1	4,0±0,2	4,3±0,2	3,8±0,0	3,7±0,1	3,6±0,2	3,6±0,2

1906	1,2±0,4	2,5±0,3	3,2±0,2	4,0±0,0	4,2±0,3	4,4±0,4	4,8±0,3	3,9±0,4	1,2±0,1
1907	0,8±0,3	3,6±0,4	3,8±0,2	4,0±0,1	4,9±0,4	4,4±0,2	3,4±0,6	3,2±0,2	2,4±0,5
1908	2,5±0,7	3,2±0,2	3,4±0,0	3,9±0,2	6,0±0,6	3,4±0,4	3,2±0,4	2,8±0,3	2,7±0,4
1909	1,2±0,7	3,6±0,4	4,2±0,2	6,6±0,4	4,2±0,2	3,3±0,3	2,8±0,1	1,8±0,2	1,4±0,3
1910	0,7±0,1	3,0±0,4	3,8±0,3	5,6±0,3	4,0±0,4	3,0±0,3	2,4±0,1	2,2±0,2	1,8±0,3
1911	2,2±0,2	4,0±0,3	4,2±0,1	4,4±0,4	5,2±0,1	5,4±0,2	5,7±0,0	3,4±0,5	2,4±0,3
1912	1,1±0,1	3,0±0,2	4,1±0,1	4,6±0,2	5,0±0,3	6,0±0,6	4,0±0,3	2,2±0,1	0,6±0,2
1913	2,2±0,5	2,6±0,7	3,0±0,2	3,6±0,0	5,4±0,0	5,1±0,2	4,6±0,4	3,5±0,3	2,4±0,4
922	-	3,6±0,0	6,6±0,7	6,7±0,5	7,6±0,4	3,6±0,4	3,5±0,5	1,6±0,2	1,2±0,4

П р и м е ч а н и я . " - " – Рост отсутствует; * – значения биомассы (без биомассы инокулюма); жирным шрифтом выделено максимальное количество биомассы для данного штамма.

Рост штаммов в разных диапазонах pH связан с влиянием кислотности на активность ферментативного аппарата культур. Существует мнение (Шиврина, 1969) о наличии тесной связи между зоной оптимальных значений pH, благоприятных для действия большинства ферментов, и зоной оптимальных pH для роста и развития гриба.

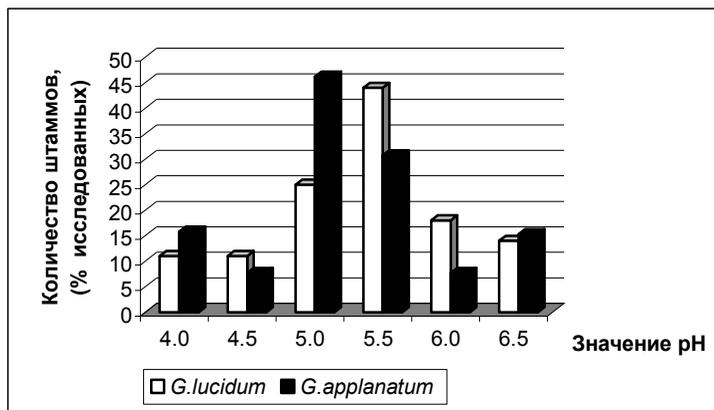


Рис. 3.1. Соотношение штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum* с разным для роста оптимумом pH среды

Известно, что штаммы одного и того же вида, выделенные в культуру из разных географических мест, имеют разное отношение к pH среды (Рипачек, 1969; Ломберг, 2005). По результатам наших опытов, аналогичная закономерность установлена также для культур, изолированных с одной географической территории. Так, 10 штаммов *G. lucidum*, которые были выделены нами из карпофоров, собранных на территории Ялтинского лесного хозяйства, отличались между собой оптимальными для биосинтеза биомассы значениями кислотности: пять штаммов этого вида лучше росли при pH 5,5; три штамма – синтезировали максимальное количество биомассы при значениях pH 5,0; штамм *G. lucidum* 1912 – при pH 6,0, а штамм *G. lucidum* 1911 – при pH 6,5.

Между значениями pH, оптимальными для роста *G. applanatum* и *G. lucidum*, и породой дерева, с которой были

собраны карпофоры грибов, корреляции не было. Так, для всех семи штаммов *G. lucidum*, которые были выделены из плодовых тел, собранных на дубе, установлены разные значения pH, способствующие максимальному образованию биомассы.

У 69% штаммов *G. applanatum* и у 81% штаммов *G. lucidum* графическое выражение зависимости накопления биомассы от кислотности среды было в виде кривой с одним пиком (рис. 3.2). У других штаммов кривая зависимости имела плато – для культур характерно более широкий диапазон pH, благоприятный для их роста (рис. 3.3).

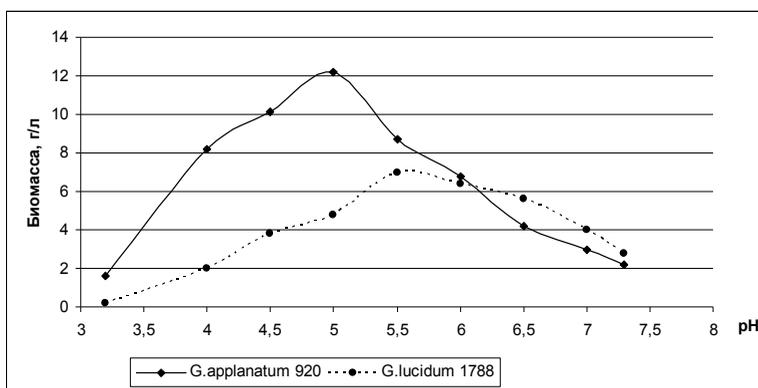


Рис. 3.2. Зависимость синтеза биомассы (г/л) *Ganoderma applanatum* 920 и *G. lucidum* 1788 от значений исходного pH синтетической среды с глюкозой

Значение pH культуральной жидкости в конце культивирования штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* уменьшалось по сравнению с исходным на 0,2–2,4 единицы. Это может быть следствием синтеза органических кислот и, вероятно, связано с источником углерода, в частности со скоростью его использования (Рипачек, 1967; Sabotič et al., 2007).

Согласно результатам проведенного дисперсного анализа двухфакторного опыта, на рост штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* больше всего влияют значения кислотности среды (36 и 37% соответственно), меньше – биологические особенности

штамма, а также взаимодействие рН и биологических особенностей штамма.

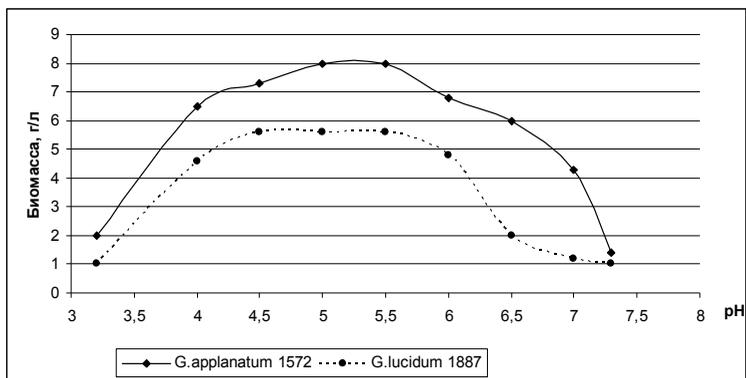


Рис. 3.3. Зависимость синтеза биомассы (г/л) *Ganoderma applanatum* 1572 и *G. lucidum* 1887 от значений исходного рН синтетической среды с глюкозой

Полученные результаты показали, что оптимальные значения и диапазон рН для роста мицелия обусловлены физиологическими особенностями штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum*. Большинство культур *G. applanatum* (61,5%) и *G. lucidum* (51,9%) росли при рН от 3,2 до 7,3. По степени способности роста при разных значениях кислотности 10 штаммов *G. applanatum* и 12 штаммов *G. lucidum*, выделенные из плодовых тел грибов, собранных на территории Украины, не отличались от штаммов этих видов другого происхождения, которые сохраняются в Коллекции культур шляпочных грибов (ИБК).

На выбранной питательной среде наибольшую биомассу накапливали штаммы *G. applanatum* и *G. lucidum* при рН 4,0–6,5. Доминирующим показателем кислотности для синтеза максимальной биомассы штаммами *G. applanatum* был рН 5,0, штаммами *G. lucidum* – 5,5. В отличие от штаммов *G. lucidum*, штаммы *G. applanatum* росли интенсивнее, что выражалось в большем количестве синтезированной ими биомассы. При благоприятном для активного роста значении рН выход

биомассы штаммов *G. applanatum* на 14-е сутки культивирования в стационарных условиях составил 5,2–13,4 г/л, штаммов *G. lucidum* – от 1,9 до 9,0 г/л.

3.3. Влияние температуры на скорость роста и морфологию культур

Требования к температуре на разных этапах развития грибов обусловлены в первую очередь биологическими особенностями вида и штамма. Рост мицелия грибов рода *Ganoderma* на плотных питательных средах характеризуют по разным критериям: диаметру колонии в см (Ганбаров, 1989); суточному приросту диаметра колоний в мм/сут (Гарибова и др., 2003); ростовым коэффициентам (Бухало, 1988; Ганбаров, 1989; Badalyan, Sakeyan, 2004), скорости радиального роста в мм/сут (Соломко и др., 2000; Филимонова и др., 2002; Ломберг, 2005; Бабицкая и др., 2006; Adaskaveg, Gilberston, 1986; Badalyan, Sakeyan, 2004). Мы придерживались последнего критерия.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что мицелий всех исследованных штаммов рода *Ganoderma* рос в широком диапазоне температур от 12 до 32 °С. У 62% штаммов *G. applanatum* и 52% штаммов *G. lucidum* рост при 5 °С отсутствовал 30 суток. Однако эта температура не была критической, поскольку в случае дальнейшей инкубации мицелия при 28 °С их рост восстанавливался. Штаммы обоих видов при 12 °С росли очень медленно по сравнению с высокими значениями температуры. Скорость радиального роста исследованных культур представлена в табл. 3.6. Эти значения скорости роста в основном соответствуют данным литературы для штаммов исследованных видов грибов (Филимонова и др., 2002; Ломберг, 2005; Бабицкая и др., 2006; Adaskaveg, Gilberston, 1986; Badalyan, Sakeyan, 2004). По выбранному показателю роста при разных температурах инкубации 10 штаммов *G. applanatum* и 12 штаммов *G. lucidum*, выделенные из плодовых тел грибов, собранных на территории Украины, не отличались от штаммов этих видов другого происхождения, которые хранятся в Коллекции культур шляпочных грибов (ИБК).

Температура 20 °С не была оптимальной ни для одного

штамма исследованных видов, что согласуется с данными литературы (Ганбаров, 1989). По показателю скорости радиального роста она оказалась более благоприятной, чем 32 °С, только для некоторых штаммов: *G. applanatum* 1895, 1898 и *G. lucidum* 1788, а для *G. lucidum* 921 – лучшей, чем 28 °С (табл. 3.6). Последняя температура была оптимальной для роста восьми штаммов *G. applanatum* и 17 штаммов *G. lucidum*, что соответствует сведениям авторов в экспериментах с дереворазрушающими грибами (Бухало, 1988; Соломко и др., 2000; Ломберг, 2005).

Температура 32 °С была оптимальной для роста пяти штаммов *G. applanatum* и 10 штаммов *G. lucidum*. Впервые получены данные относительно максимальной скорости роста штаммов *G. applanatum* при 32 °С. Эта температура была также оптимальной для роста близкого к *G. applanatum* вида *G. australe* (Fr.) Pat. из Флориды (Yeh et al., 2000).

Таблица 3.6. Скорость радиального роста мицелия исследованных штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum* при разных значениях температуры инкубации, мм/сут

Вид гриба, номер штамма	Температура, °С		
	20 ± 1	28 ± 1	32 ± 1
1	2	3	4
<i>G. applanatum</i>			
920	5,3 ± 0,5	6,3 ± 0,3	7,1 ± 0,2
1701	3,6 ± 0,4	9,3 ± 0,4	8,9 ± 0,3
1672	3,7 ± 0,3	8,1 ± 0,2	8,4 ± 0,4
1530	6,0 ± 0,4	8,7 ± 0,2	7,4 ± 0,1
1552	3,6 ± 0,2	6,0 ± 0,2	9,1 ± 0,1
1553	4,8 ± 0,2	8,1 ± 0,2	8,7 ± 0,3
1572	4,0 ± 0,3	8,7 ± 0,7	8,4 ± 0,4
1593	4,3 ± 0,2	8,2 ± 0,9	8,4 ± 0,2
1895	5,8 ± 0,6	6,3 ± 0,2	2,1 ± 0,1
1896	5,0 ± 0,0	7,8 ± 0,3	5,1 ± 0,5
1897	4,8 ± 0,2	7,7 ± 0,1	4,8 ± 0,1
1898	5,0 ± 0,0	5,9 ± 0,3	3,7 ± 0,4
1899	3,3 ± 0,3	8,5 ± 0,3	7,9 ± 0,1

<i>G. lucidum</i>			
1	2	3	4
921	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,7	3,4 ± 0,1
1670	3,8 ± 0,1	7,9 ± 0,6	9,1 ± 0,4
1887	3,5 ± 0,7	7,3 ± 0,3	6,6 ± 0,2
1888	3,1 ± 0,2	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,5
1889	4,4 ± 0,1	11,8 ± 0,2	10,6 ± 0,1
1607	5,2 ± 0,2	8,5 ± 0,0	7,9 ± 0,2
1608	5,1 ± 0,1	7,7 ± 0,2	8,6 ± 0,2
1787	4,5 ± 0,1	7,5 ± 0,5	8,0 ± 0,1
1788	7,0 ± 0,1	7,3 ± 0,3	5,4 ± 0,2
1621	5,7 ± 0,3	10,4 ± 0,2	9,8 ± 0,1
1900	5,6 ± 0,3	9,9 ± 0,1	9,5 ± 0,2
1901	4,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1
1902	5,3 ± 0,4	7,7 ± 0,4	10,5 ± 0,4
1903	7,3 ± 0,0	10,0 ± 0,1	11,5 ± 0,1
331	4,0 ± 0,2	7,4 ± 0,1	5,1 ± 0,2
1683	4,4 ± 0,1	6,0 ± 0,1	5,3 ± 0,0
1904	4,7 ± 0,1	7,3 ± 0,4	6,6 ± 0,1
1905	4,3 ± 0,2	7,3 ± 0,1	6,5 ± 0,1
1906	4,8 ± 0,0	6,8 ± 0,1	4,8 ± 0,2
1907	3,2 ± 0,1	7,2 ± 0,2	6,9 ± 0,3
1908	4,8 ± 0,1	7,8 ± 0,7	7,9 ± 0,2
1909	3,8 ± 0,0	6,3 ± 0,4	7,7 ± 0,2
1910	3,7 ± 0,2	4,8 ± 0,5	6,8 ± 0,3
1911	2,6 ± 0,1	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,1
1912	4,3 ± 0,1	7,3 ± 0,2	6,5 ± 0,0
1913	3,1 ± 0,2	5,0 ± 0,0	4,6 ± 0,1
922	5,1 ± 0,2	10,3 ± 0,2	10,2 ± 0,3

Примечание. Жирным шрифтом выделена максимальная скорость роста мицелия.

Одной из важных характеристик конкретных штаммов является их скорость роста при оптимальных параметрах культивирования. Согласно предложенному М.Л. Ломберг (2005) разделению культур по скорости роста разных видов бази-

диомицетов, к быстрорастущим относят культуры, радиальная скорость которых равна или больше 8 мм/сут. К этой группе относится 61,5% исследованных нами штаммов *G. applanatum* и 37,0% штаммов *G. lucidum*. Только *G. lucidum* 921, радиальная скорость роста которого была меньше 4 мм/сут, был медленно-растущим. Наибольшую группу штаммов *G. lucidum* (59,3% общего числа) и 38,5% штаммов *G. applanatum* по этому критерию составили те, которые способны расти с радиальной скоростью роста от 4 до 8 мм/сут и относятся к промежуточной группе (табл. 3.7). Максимальную радиальную скорость имели *G. applanatum* 1701, 1552 (более 9 мм/сут) и *G. lucidum* 1889, 1903 (более 11 мм/сут).

Анализ данных разделения исследованных видов грибов на группы по скорости радиального роста и отношению к температурному оптимуму, представленный на рис. 3.4. и 3.5, показывает, что при 20 °С наибольший процент составили штаммы *G. applanatum* (61,5%) и *G. lucidum* (55,6%) со скоростью роста 4–6 мм/сут.

У *G. applanatum* как при 28, так и при 32 °С доминировала одна группа штаммов со скоростью роста 8–10 мм/сут. В отличие от *G. applanatum*, при 28 °С преобладала группа *G. lucidum* со скоростью роста 6–8 мм/сут, а при 32 °С разница между количеством штаммов с разными показателями скорости роста была маленькой (рис. 3.5). Таким образом, среди штаммов *G. applanatum* при 28 и 32 °С выявлен значительно больший процент быстрорастущих штаммов, чем у *G. lucidum* (рис. 3.4, 3.5).

Полученные результаты свидетельствуют о значительной штаммовой вариабельности *G. applanatum* и *G. lucidum* по скорости радиального роста в зависимости от температурного режима, что совпадает с данными М.Л. Ломберг (2005).

На основе проведенного дисперсного анализа двух-факторного опыта можно сделать вывод о том, что данный показатель роста штаммов *G. applanatum* зависел в большей степени от взаимодействия биологических особенностей штамма и температуры (41,9%). Скорость роста штаммов *G. lucidum* в основном определена биологическими особенностями штамма (46,5%) и влиянием температуры (36,4%).

Таблица 3.7. Максимальная скорость роста мицелия культур *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum* при оптимальной температуре инкубации

Штамм <i>G. applanatum</i>	Vr, мм/сут	Штамм <i>G. lucidum</i>	Vr, мм/сут
Быстрорастущие			
1701	9,3±0,4	1889	11,8±0,2
1552	9,1±0,1	1903	11,5±0,1
1530	8,7±0,2	1902	10,5±0,4
1553	8,7±0,3	1621	10,4±0,2
1572	8,7±0,7	922	10,3±0,2
1899	8,5±0,3	1900	9,9±0,1
1593	8,4±0,2	1670	9,1±0,4
1672	8,4±0,4	1608	8,6±0,2
		1607	8,5±0,0
		1787	8,0±0,1
Промежуточная группа			
1896	7,8±0,3	1908	7,9±0,2
1897	7,7±0,1	1909	7,7±0,2
920	7,1±0,2	331	7,4±0,1
1895	6,3±0,2	1901	7,3±0,1
1898	5,9±0,3	1905	7,3±0,1
		1912	7,3±0,2
		1788	7,3±0,3
		1887	7,3±0,3
		1904	7,3±0,4
		1907	7,2±0,2
		1906	6,8±0,1
		1910	6,8±0,3
		1683	6,0±0,1
		1888	5,2±0,2
		1911	5,1±0,1
1913	5,0±0,0		
Медленнорастущие			
-	-	921	3,4±0,1

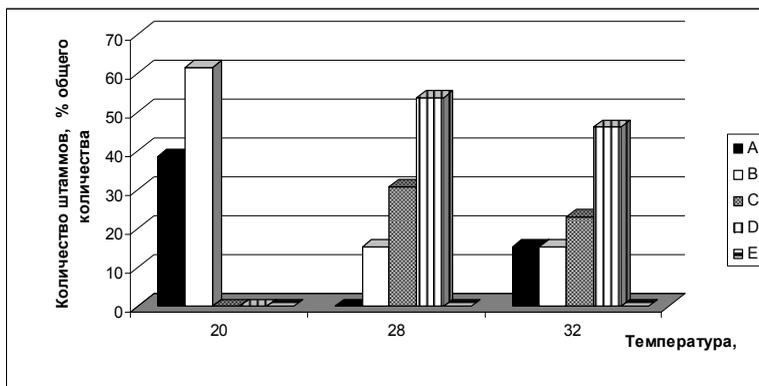


Рис. 3.4. Скорость радиального роста (мм/сут) штаммов *Ganoderma applanatum* (% общего количества исследованных штаммов) при разных температурах инкубации: А – 2–4, В – 4–6, С – 6–8, D – 8–10, E – 10–12

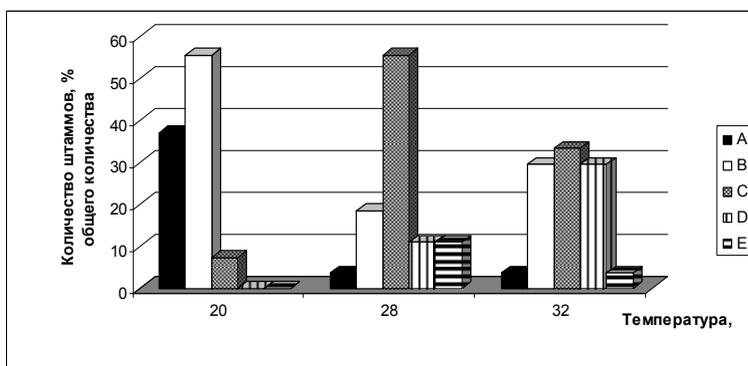


Рис. 3.5. Скорость радиального роста (мм/сут) штаммов *G. lucidum* (% общего количества исследованных штаммов) при разных температурах (°C) инкубации: А – 2–4, В – 4–6, С – 6–8, D – 8–10, E – 10–12

В литературе нет данных об отсутствии влияния температуры на морфологию колоний штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* (Гарибова, 2003; Автономова, 2006), но в результате

экспериментов мы установили, что этот фактор влияет на некоторые морфологические характеристики.

При разных температурах инкубации штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* мы наблюдали такие основные типы колоний (Stalpers, 1978): 1 – кожистую; 2 – войлочную; 3 – ватную; 4 – мучнистую. Морфологии колоний некоторых штаммов обоих видов были смешанными: кожисто-войлочная, войлочно-кожистая, кожисто-ватная, мучнисто-кожистая. В литературе был описан ватно-войлочный тип колоний для мицелия штаммов *G. lucidum* (Цизь, Бисько, 2007).

В ходе эксперимента установлено, что для штаммов *G. lucidum* характерно большее разнообразие морфологий колоний, чем для штаммов *G. applanatum* при всех исследованных температурах (рис. 3.6, 3.7). Особенно видна эта разница между видами при температуре инкубации 20 и 28 °С. Установлено доминирование кожистого типа мицелиальных колоний для штаммов *G. applanatum* при всех исследованных температурах, а для штаммов *G. lucidum* – только при 28 и 32 °С (рис. 3.6, 3.7). Войлочные колонии чаще наблюдали у штаммов *G. lucidum* при 20 °С (рис. 3.7). Отметим, что 5 из 10 штаммов *G. lucidum*, которые были выделены в культуру с территории Ялтинского лесного хозяйства, имели одинаковый тип мицелиальных колоний при всех выбранных температурах инкубации.

Увеличение температуры инкубации с 20 до 32 °С стимулировало формирование большего количества типов мицелиальных колоний у *G. applanatum* (рис. 3.6), способствовало появлению и интенсивности пигментации у большинства штаммов обоих видов, изменяло морфологию мицелиальных колоний у 7 штаммов *G. applanatum* и 17 штаммов *G. lucidum*.

Среди исследованных культур были и такие, морфология колоний которых не изменялась (6 штаммов *G. applanatum* и 10 штаммов *G. lucidum*). Температура значительно влияла на зональность культур, меньше – на окрашивание реверзума и внешний край колонии. Морфологические показатели мицелиальных колоний только *G. lucidum* 1906, 1908, 1909 в диапазоне температур 20–32 °С оставались стабильными. Штаммы *G. applanatum* и *G. lucidum*, выделенные из плодовых

тел грибов, собранных на территории Украины, по морфолого-культуральным особенностям колоний не отличались от штаммов этих видов другого происхождения, которые хранятся в Коллекции культур шляпочных грибов (ИБК).

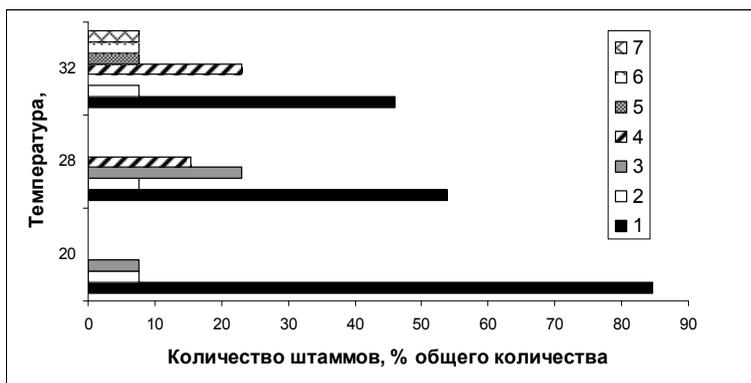


Рис. 3.6. Типы колоний штаммов *Ganoderma applanatum* при разной температуре (°C) инкубации: 1 – кожистая, 2 – мучнисто-кожистая, 3 – войлочная, 4 – ватная, 5 – мучнистая, 6 – кожисто-войлочная, 7 – войлочно-кожистая

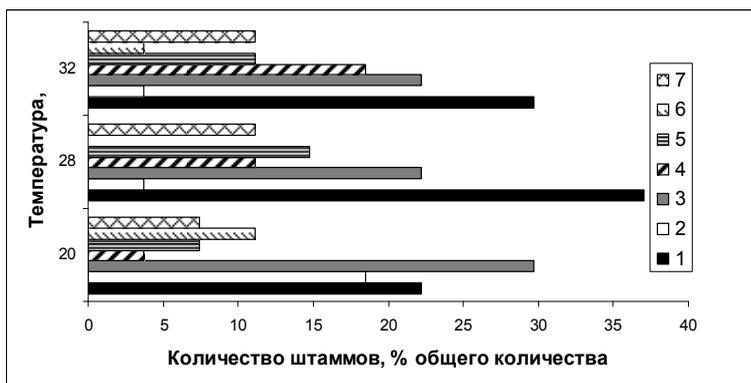


Рис. 3.7. Типы колоний штаммов *G. lucidum* при разной температуре (°C) инкубации: 1 – кожистая, 2 – мучнисто-кожистая, 3 – войлочная, 4 – ватная, 5 – кожистоватная, 6 – кожисто-войлочная, 7 – войлочно-кожистая

С возрастом при всех температурах инкубации большинство мицелиальных колоний *G. lucidum*, в отличие от штаммов *G. applanatum*, появлялась кожистая пленка. Такая же тенденция для штаммов *G. lucidum* была отмечена Л.О. Завьяловой с соавт. (2002).

Статистическое сравнение абсолютных величин скорости роста штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* при разных температурах инкубации позволило установить оптимумы для всех исследованных культур. Для большинства штаммов обоих исследованных видов оптимальной была температура 28 °С, для других – 32 °С. Внимания заслуживают 8 штаммов *G. applanatum* со скоростью роста 8,4–9,3 мм/сут и 10 штаммов *G. lucidum* со скоростью роста 8,0–11,8 мм/сут, которые можно рассматривать как наиболее перспективные и важные для культивирования на жидких питательных средах.

3.4. Влияние температуры на жизнедеятельность вегетативного мицелия культур

Вне сомнений, жизнеспособность грибов в условиях высоких температур, как и их реакция на температурные условия, неодинаковы. Для любого вида необходимы определенные температурные параметры, характерные для его природного местообитания. Поэтому температурные границы, максимум и оптимум роста являются важными физиологическими характеристиками разных штаммов, имеющих большое значение для реализации процесса культивирования. Исследователями (Жданова, 1983; Бухало, 1989) установлено, что для большинства видов грибов температуры ниже 4 и выше 37 °С являются критическими. Установлено (Шиврина, 1969; Жданова, 1983), что максимальная температура для роста некоторых грибов находится в пределах 35–40 °С. На сегодняшний день, жизнедеятельность вегетативного мицелия разных представителей рода *Ganoderma* при высоких температурах инкубации остается мало исследованным направлением. Из литературы известно, что штаммы *G. tsugae* не растут при температуре инкубации более 30 °С, штаммы *G. meredithiae* Adask. & Gilb. – выше 35 °С, а *G. lucidum* – более 38 °С (Adaskaveg, Gilberston,

1988). М.Л. Ломберг (2005) было выяснено, что *G. lucidum* 921, 922 и *G. applanatum* 920 при температуре инкубации 37 °С теряли жизнеспособность вегетативного мицелия, в отличие от *G. lucidum* 1607 и 1621, которые потом восстанавливали его рост при 26 °С.

Представляло интерес детальное изучение жизнедеятельности штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum* разного происхождения по показателю наличия или отсутствия роста при высоких температурах (от 33 до 45 °С) инкубации. Нами отмечено наличие мицелия у всех исследованных штаммов на третьи сутки культивирования при температуре 33 °С. При дальнейшем увеличении температуры инкубации наблюдали значительную штаммовую вариабельность культуры (табл. 3.8).

Большинство исследованных штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* увеличение температуры переносило отрицательно. Так, для 30,7% штаммов *G. applanatum* установлено критическую температуру роста 39 °С, а для 37,1% штаммов *G. lucidum* – 36 °С. В то же время выявлены штаммы обоих видов, которые сохраняли жизнедеятельность вегетативного мицелия в диапазоне температур 34–44 °С. Среди культур *G. lucidum* максимальную жизнедеятельность мицелия имели 1902, 1903, 1889, способные восстанавливать рост мицелия после 3-суточной инкубации при температуре 44 °С. Уникальным был *G. applanatum* 1899, который восстанавливал рост мицелия даже после инкубации при 43 °С.

По мнению В. Рипачека (1967), стойкость грибов к высоким температурам зависит от величины температурного максимума и оптимума роста мицелия. Согласно этому, виды грибов с более высоким температурным оптимумом для роста являются более стойкими по отношению к высоким экстремальным температурам. Сопоставление ранее выявленного нами температурного оптимума для роста всех исследованных культур *G. applanatum* и *G. lucidum* (Круподьорова, 2007) с их температурным максимумом согласуется с этим предположением только частично.

Считаем, что принципиально важным для понимания стойкости грибов по отношению к экстремальным температурам является анализ их географического происхождения.

Так, штаммы *G. lucidum*, выделенные нами в культуру из плодовых тел, собраны на территории Ялтинского лесного хозяйства, имели почти одинаковые показатели критических температур: для 8 штаммов – 36 °С, для 2 штаммов – 37 °С. Вместе с тем *G. applanatum* 1899 и 1898 такого же происхождения очень отличались по отношению мицелия к высоким температурам (табл. 4.16). Последнее можно объяснить тем, что эти две культуры были выделены из грибов, которые росли на деревьях на разной высоте над уровнем моря. Соответственно, штамм, выделенный из карпофора, который рос выше уровня моря, имел пониженные температурные пределы для мицелиального роста. Аналогичскую закономерность установил В. Рипачек (1967) для *Merulius lacrymans* (Wulf.) Sch. Следовательно, определяющим фактором жизнедеятельности культур являются их микроклиматические условия местопроизрастания плодовых тел, из которых они были выделены.

Известно (Билай, 1989), что гибель клеток мицелия при высоких температурах инкубации является результатом нарушения координации синтетических процессов клетки, в частности денатурации белков. Высокие температуры, по данным А.М. Гродзинского (1973), могут также разрушать деятельность ферментов, уменьшать коэффициент дыхания, усиливать гидролитические процессы в клетках, отравлять протоплазму вредными продуктами распада, например аммиаком.

Таким образом, исследованные штаммы *G. applanatum* и *G. lucidum* отличаются между собой по жизнедеятельности вегетативного мицелия при высоких температурах инкубации (34–44 °С), что обусловлено микроклиматическими условиями, характерными для географического местопроизрастания плодовых тел, и генетическими особенностями штаммов. Большинство культур обоих видов плохо переносили увеличение температуры инкубации: для 30,7% штаммов *G. applanatum* установлена критическая температура роста 39 °С, для 37,1% штаммов *G. lucidum* – 36 °С. Среди культур *G. lucidum* следует выделить штаммы 1902, 1903, 1889, которые при температуре 28 °С были способны восстанавливать рост мицелия после

3-суточной инкубации при температуре 44 °С, а среди *G. applanatum* – штамм 1899, который восстанавливал рост мицелия после инкубации 43 °С. По жизнеспособности вегетативного мицелия штаммы *G. applanatum* и *G. lucidum*, выделенные из плодовых тел грибов, собранных на территории Украины, не отличались от штаммов этих видов другого происхождения, которые хранятся в Коллекции культур шляпочных грибов (ИБК).

4. БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУР

Способность видов рода *Ganoderma* синтезировать биологически активные соединения с разным характером действия способствует созданию на их основе современных препаратов и биологически активных добавок с профилактически-лечебными свойствами.

4.1. Антимикробная активность культур

Массовое, во многих случаях неоправданное, использование антибиотиков способствует появлению и распространению относительно стойких штаммов патогенных микроорганизмов. Большой проблемой являются внутрибольничные инфекции, в частности наиболее распространены среди них – стафилококковые. В некоторых больницах среди выделенных стафилококков частота метициллинстойких штаммов, как правило, стойких не только к метициллину, а к другим бета-лактамам антибиотикам, составляет 80%. По данным Ю.В. Дудника (1999), проблема увеличения стойкости патогенных микроорганизмов к лекарственным препаратам делает актуальным поиск новых эффективных природных антибиотиков. Последнее время возрос интерес исследователей (Anke, 1989; Wasser, 1999a, b; Berdy, 2005) к высшим базидиомицетам как к потенциальным источникам биологически активных веществ, в том числе антибиотиков. Так, в литературе приведены результаты, свидетельствующие о наличии антимикробной активности экстрактов

плодовых тел (Smania, 2001; Dighe, 2002; Tsvetkova, 2006) и культуральной жидкости (Semerždieva, 1986) разных видов высших базидиальных грибов, в частности видов рода *Ganoderma* (*G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. oregonense*, *G. australe*) против бактерий родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* и *Escherichia coli* (Автономова, 2006; Semerždieva, 1986; Wasser, Weis, 1999a, b; Roberts et al., 2001; Smania et al., 2001; Gao et al., 2003; Sornprasert, 2003).

Результаты наших исследований показали отсутствие антимикробной активности смеси культуральной жидкости с мелкодисперсной биомассой 13 штаммов *G. applanatum* и 27 штаммов *G. lucidum* в отношении к использованным тест-культурам: *Staphylococcus aureus* FDA 209P, INA 00761, INA 00762, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *B. pumilis* NCTC 8241, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ATCC 8461, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259, *Candida albicans* INA 00763 и *Aspergillus niger* INA 00760.

Мы установили антибактериальную активность смеси культуральной жидкости с мелкодисперсной биомассой (сконцентрированной в 10 раз) у 6 штаммов *G. applanatum* и 8 штаммов *G. lucidum* из Коллекции культур шляпочных грибов против клинических изолятов – метициллинстойкого и метициллинчувствительного штаммов *Staphylococcus aureus*, а также *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (табл. 4.1). Наличие активности отмечено у 4 штаммов *G. applanatum* и 5 штаммов *G. lucidum*, выделенных в культуру из плодовых тел, которые были собраны на территории Украины.

По спектру антимикробного действия исследованные нами штаммы можно разделить на три группы: *G. applanatum* 1552 и *G. lucidum* 1908, 1905 ингибировали рост всех трех вышеуказанных тест-бактерий, *G. applanatum* 1530 и *G. lucidum* 1898, 1912 – двух штаммов *S. aureus*, остальные культуры (*G. applanatum* 1672, 1701, 1553 и *G. lucidum* 1670, 1889, 1903, 1607, 1910) – только одной тест-бактерии – метициллинстойкого штамма *S. aureus* (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Антибактериальная активность смеси культуральной жидкости с мелкодисперсной биомассой исследованных штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum*

Штамм	Длительность культивирования, сут	Диаметр зоны ингибирования роста тест-культур, мм		
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
		метициллин-стойкий	метициллин-чувствительный	
<i>G. applanatum</i>				
1552	14	15	14	10
	21	-	-	-
1530	14	14	10	-
	21	-	-	-
1898	14	-	-	-
	21	9	9	-
1672	14	12	-	-
	21	13	-	-
1701	14	-	-	-
	21	15	-	-
1553	14	16	-	-
	21	14	-	-
<i>G. lucidum</i>				
1908	14	10	10	16
	21	-	-	-
1905	14	-	-	-
	21	12	12	9
1912	14	-	-	-
	21	10	10	-
1670	14	16	-	-
	21	-	-	-
1889	14	13	-	-
	21	-	-	-
1903	14	-	-	-
	21	(14)	-	-
1607	14	(14)	-	-
	21	-	-	-
1910	14	11	-	-
	21	-	-	-

Примечания. В скобках указан диаметр зоны ослабленного роста тест-культур; " - " – антибактериальная активность не выявлена.

Следует выделить *G. lucidum* 1908, который замедлял рост *B. subtilis* более активно, чем рост обоих штаммов стафилококков. Особенности проявления антибактериальной активности вышеуказанными штаммами, возможно, связаны с биосинтезом антибактериальных соединений разной химической природы.

Штаммы *G. lucidum* 1607 и 1903 образовывали соединения, которые хорошо диффундируют в агаризованную среду, однако они не ингибировали, а только ослабляли рост метициллин-стойкого штамма *S. aureus* (табл. 4.1). Некоторые авторы (Шиврина, 1969; Semerždieva, 1986) считают длительное поверхностное или глубинное культивирование высших базидиальных грибов необходимым условием для образования антибиотиков. Мы наблюдали аналогичную тенденцию только для некоторых штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum*. Так, увеличение длительности культивирования с 14-х по 21-е сут способствовало проявлению антимикробной активности у 33% штаммов *G. applanatum* и 38% – у *G. lucidum* (табл. 4.1). И наоборот, длительное культивирование (в течение 21 сут) подавляло антибиотическую активность у 33% штаммов *G. applanatum* и 62% – у *G. lucidum*. При этом активность 33% штаммов *G. applanatum* на 14-е и 21-е сутки роста была почти одинаковой (табл. 4.1).

Известно, что антибактериальные свойства грибов могут быть обусловлены образованием в процессе их роста органических кислот (Gadd, 1999; Loewus, 1999) тритерпеноидов или стероидов (Wasser, Weis, 1979, 1999a, b; Lehmkuhl et al., 2000). В выбранных нами условиях культивирования на 14-е и 21-е сутки pH культуральной жидкости составил 6,0, за исключением штамма *G. lucidum* 1908 (pH 7,0). Эти уровни pH не являются бактерицидными относительно тест-культур, поэтому проявление антибактериальной активности в наших опытах связано, вероятно, с синтезом тритерпеноидов и/или стероидов. Зоны ингибирования роста обоих штаммов *S. aureus* исследованными нами штаммами *G. applanatum* и *G. lucidum* совпадают по размерам с приведенными в литературе для мицелия *Coriolus hirsutus* (Wulf.) Pat., *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bond et Sing, *Merulius minor* Falck и *Gleophyllum sepiarium* (Wulf.) P. Karst. (Шиврина, 1969), *Ganoderma lucidum* (Автономова, 2006). Зоны подавления

роста *B. subtilis* (табл. 4.1) протестированными нами штаммами *G. applanatum* и *G. lucidum* имели размеры, близкие к описанным для смеси культуральной жидкости и биомассы *Daedalea confragosa* (Bolt.) Pers., *Gleophyllum saepiarium*, *Serpula lacrymans* (Wulf.) J. Schröt., *Laetiporus sulphureus*, *G. applanatum* (Semerždieva et al., 1986) и мицелия *G. lucidum* (Автономова, 2006).

По степени чувствительности к метаболитам изученных штаммов грибов (за исключением *G. lucidum* 1908) тест-культуры бактерий образуют следующий ряд: *S. aureus* (метициллин-стойкий) > *S. aureus* (метициллинчувствительный) > *B. subtilis* ATCC 6633.

Сравнивая антибиотическую активность штаммов обоих исследованных видов *Ganoderma* в выбранных условиях культивирования, следует выделить *G. applanatum* 1552, *G. lucidum* 1908 и 1905 с наиболее широким спектром антимикробной активности. Однако большинство штаммов были эффективными только к одному метициллинстойкому штамму *S. aureus*. Четкой межвидовой разницы по степени и спектру антимикробной активности у протестированных нами штаммов не выявлено.

Таким образом, нами установлено наличие антибактериальной активности смеси культуральной жидкости с мелкодисперсной биомассой 6 штаммов *G. applanatum* и 8 штаммов *G. lucidum*. Штаммы *G. applanatum* 1552 и *G. lucidum* 1908, выделенные в культуру из плодовых тел, собранных на территории Украины, наиболее активны против метициллинчувствительного штамма *S. aureus* (стойкого к 0,125 мкг/мл оксациллина), метициллинстойкого штамма *S. aureus* (стойкий к 32 мкг/мл оксациллина) и *Bacillus subtilis*. Указанные культуры представляют интерес для дальнейших детальных исследований условий биосинтеза антибиотических веществ, установления их структуры и химического состава.

4.2. Антивирусная активность культур

Проблема стойкости растений к таким вирусам, как вирус табачной мозаики (ВТМ) имеет давнюю историю и до сих пор не решена. При разработке способов борьбы с фитопатогенными

вирусами принципиально важным является использование экологически безопасных соединений, которые способны стимулировать стойкость растений при искусственном введении их в ткани. К таким соединениям, по данным О.Г. Коваленко, (1983), относятся некоторые биополимеры, такие как белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Полисахаридам сегодня исследователи уделяют особенное внимание. Уже установлено, что развитие ВТМ ингибируется ламинараном (полисахарид из водоросли *Laminaria cichoriodes* Miyabe) (Реунов и др., 2000), фукоиданом (сульфатированный полисахарид из *Fucus evanescens* С. Agardh) (Лапшина и др., 2006, 2007), 1,3;1,6-β-D глюканами некоторых грибов, в частности *Phytophthora megasperma* Drechsler (Kopp et al., 1989; Ronhier et al., 1995). Присутствие 1,3; 1,6-β-D глюканов у представителей класса Basidiomycetes может обуславливать в них наличие анти-вирусной активности. Существуют только эпизодические данные инактивации вируса табачной мозаики продуктами жизнедеятельности высших базидиальных грибов *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Amanita phalloides* (Vaill: Fr.) Link (Шиврина, 1969), *Tremella mesenterica* Retz. (Коваленко, 2009).

Учитывая необходимость проведения эксперимента только на синтетической питательной среде, было выбрано по 7 штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum*, которые, согласно Т.А. Круподеровой (2008), накапливали наибольшее количество биомассы на синтетической среде с глюкозой.

В результате исследований впервые выявлено, что все штаммы *G. applanatum* (в т.ч. 4 штамма, изолированные из плодовых тел этого вида, собранных на территории Украины) и *G. lucidum* на растениях *Datura stramonium* L. имеют антивирусную активность. Инфекционность и количество некрозов на листьях дурмана, как правило, варьировала в зависимости от штамма гриба и концентрации водного раствора его лиофилизированной культуральной жидкости. Для 5 штаммов из 14 исследованных не отмечено прямой зависимости между концентрацией препарата и степенью подавления роста ВТМ (табл. 4.2). Среди культур обоих видов следует выделить *G. lucidum* 1887, максимальное значение ингибирующего действия которого установлено при концент-

рации культуральной жидкости 10 мг/мл, и оно не изменялось при ее увеличении до 100 мг/мл. Наиболее активными были *G. applanatum* 1553, который подавлял развитие вирусной инфекции на 98,4%, и *G. lucidum* 1887 с ингибирующей активностью более 86%.

Таблица 4.2. Подавление роста ВТМ на растениях дурмана после обработки водными растворами культуральной жидкости штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum* (%)

Вид гриба, номер штамма	Концентрация культуральной жидкости, мг/мл			
	1	10	100	1000
<i>G. applanatum</i>				
920	65±11	70±5 ⁰	95±3 ⁰	93±8
1701	5±0,9	14±1	18±5	18±1,4
1672	68±8	78±7	70±6	74±10
1530	82±4	86±6	78±2,7	71±9,6 ⁰
1552	22±9	21±7	20±4,3	28±3,0
1553	75±7	78±6	80±9	98,4±2 ⁰
1899	46±8,4	78±9 ⁰	85±2,5	89±3
<i>G. lucidum</i>				
1887	83±4	86±1,6	85±4	82±4 ⁰
1607	22±1,4	22±9	23±2,0	21±1,4
1608	48±1,2	54±7	62±6	76±8
1788	20±2,5 ⁰	56±16 ⁰	80±4	82±4
1621	10±3	12±1,3	15±9	23±1
1900	46±1,1	56±6,5	70±10	74±4 ⁰
922	26±7	28±8	26±10	30±4

⁰ – $p > 5\%$.

Можно предположить, что уменьшение количества некрозов при обработке листьев культуральной жидкостью штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum*, в сравнении с контролем, связано со способностью биологически активных веществ грибов стимулировать защитные механизмы растения. Причина подавления развития ВТМ может быть также обусловлена ингибирующим действием препарата на проникновение вируса в клетки и/или на внутриклеточную репродукцию вируса, что влечет, по

данным исследователей (Коваленко, 1983, 1988; Лапшина, 2006, 2007), изменения в метаболизме ВТМ-инфицированных клеток.

Таким образом, анализируя сказанное выше, в аспекте решения проблемы защиты растений целесообразно проводить поиск и скрининг на антивирусную активность культур из рода *Ganoderma*. Вне сомнений, необходимо будет еще изучить химическую природу антивирусных веществ и механизмы их действия. Можно надеяться, что такое направление исследований позволит расширить спектр использования лекарственных грибов *G. applanatum* и *G. lucidum*.

4.3. Антиоксидантная активность культур

Особенное значение в развитии клеточной патологии имеют процессы свободнорадикального (перекисного) окисления липидов (ПОЛ). Введение в организм природных или синтетических антиоксидантов позволяет тормозить развитие свободнорадикальных реакций, в т.ч. процессов ПОЛ в биомембранах. Позитивные результаты многочисленных экспериментов (Капич, 1992, 1995, 2007; Шишкина, Капич, 2006; Jones, Janardhanan, 2000; Asatiani et al., 2007) свидетельствуют о перспективности использования биоантиоксидантов грибного происхождения, которые являются природными метаболитами. На современном этапе исследована антиоксидантная активность (АОА) плодовых тел представителей рода *Ganoderma* (Jones, Janardhanan, 2000), мицелиальной биомассы и культуральной жидкости, которые были получены при глубинном культивировании на жидких питательных средах (Капич 1992, 1995; Asatiani et al., 2007).

Данные литературы относительно влияния длительности культивирования и источника биологического материала – биомассы или культуральной жидкости на АОА – довольно отличаются. Антиоксидантная активность культуральной жидкости и биомассы культур из 13 семейств (*Coprinus*, *Coriolus*, *Flammulina*, *Lentinula*, *Lepista*, *Marasmius*, *Hypholoma*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Stropharia*, *Suillus*, *Volvariella*) была установлена только на 21-е сут культивирования (Badalyan, Gasparyan, 2002). АОА культуральной жидкости на 21-е сут была

более высокой, чем активность биомассы. Согласно данным А.Н. Капича (1995), АОА мицелия *Coriolus hirsutus*, *C. versicolor* (L.: Fr.) Quél., *Daedaleopsis confragosa* (Bolt.: Fr.) Schroet., *Fomes fomentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Laxitextum bicolor* (Pers.: Fr.) P. Karst., *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass., *Schizophyllum commune* Fr., *Pleurotus ostreatus* была меньше, чем АОА культуральной жидкости. В проведенных нами экспериментах установлено, что АОА мицелия и культуральной жидкости двух штаммов *G. lucidum* изменялась в зависимости от длительности поверхностного культивирования.

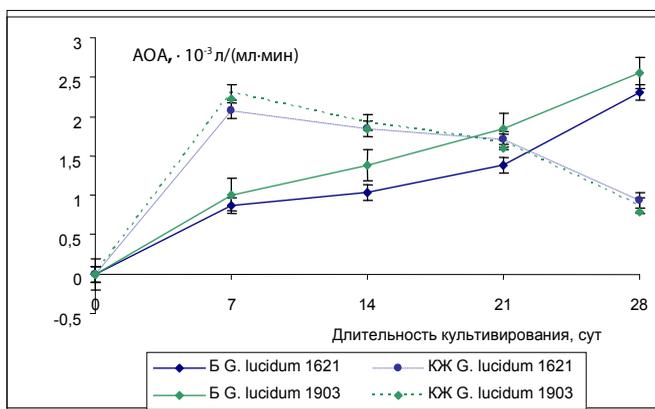


Рис. 4.1. Антиоксидантная активность (АОА) культуральной жидкости (КЖ) и биомассы (Б) исследованных штаммов *G. lucidum* при стационарном выращивании

Увеличение экспозиции культивирования повышало АОА биомассы, а АОА культуральной жидкости, наоборот, уменьшалось (рис. 4.1). Для штаммов *Flammulina velutipes* (Curtis: Fr.) отмечена такая же закономерность (Kvasko, Krupodorova, 2007).

Согласно результатам наших экспериментов, величина АОА культуральной жидкости на 7-е сут культивирования почти не отличалась от АОА биомассы на 28-е сут культивирования, поэтому в дальнейшем исследовали культуральную жидкость после 7 сут культивирования.

Культуральная жидкость исследованных культур имела

разную степень АОА. Последняя варьировала от $0,7 \cdot 10^{-3}$ до $3,9 \cdot 10^{-3}$ л/(мл·мин) в культуральной жидкости штаммов *G. applanatum* а у штаммов *G. lucidum* – от $0,4 \cdot 10^{-3}$ до $5,7 \cdot 10^{-3}$ л/(мл·мин) (табл. 4.3).

Таблица 4.3. Антиоксидантная активность (АОА) культуральной жидкости исследованных штаммов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum* на 7-е сут культивирования

Вид, номер штамма	АОА, 10^{-3} л/(мл·мин)
<i>G. applanatum</i>	
920	2,1±0,5
1701	0,7±0,2
1672	3,5±0,3
1530	3,3±0,1
1552	1,3±0,1
1553	0,7±0,2
1572	2,8±0,2
1593	2,2±0,1
1895	1,5±0,2
1896	2,0±0,4
1897	3,9±0,2
1898	1,7±0,1
1899	0,7±0,1
<i>G. lucidum</i>	
921	1,1±0,2
1670	2,4±0,1
1887	2,2±0,1
1888	2,2±0,0
1889	5,7±0,5
1607	2,1±0,7
1608	1,7±0,4
1787	2,4±0,3
1788	2,0±0,1

1621	2,1±0,7
1900	1,9±0,1
1901	0,4±0,0
1902	0,8±0,2
1903	2,3±0,1
331	1,1±0,1
1683	2,0±0,1
1904	1,1±0,2
1905	0,8±0,3
1906	3,9±0,4
1907	0,9±0,2
1908	2,0±0,3
1909	1,4±0,2
1910	1,9±0,1
1911	2,3±0,1
1912	3,3±0,0
1913	1,6±0,2
922	1,3±0,3

Анализ этих данных свидетельствует о зависимости АОА от штаммов, что согласуется с опубликованными результатами (Капич, 1995; Asatiani et al., 2007). Следует выделить штаммы с наибольшей активностью – *G. applanatum* 1530, 1897, 1672 и *G. lucidum* 1889, 1906, 1912.

Нами не выявлено взаимосвязи между АОА штаммов *G. applanatum*, *G. lucidum* и их географическим происхождением. Хотя, согласно опубликованным данным (Jones, Janardhanan, 2000), экстракты из плодовых тел *G. lucidum* из Южной Индии имели более высокую антиоксидантную активность, чем экстракты из *Ganoderma* spp., собранные на о. Тайвань. Мы продемонстрировали довольно широкий диапазон показателя АОА – от $0,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$ до $3,9 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ л/(мл·мин) у штаммов *G. lucidum*, которые были выделены из плодовых тел, собранных на территории Ялтинского лесного хозяйства. АОА культуральной жидкости штаммов *G. applanatum*, изолированные нами

из карпофоров грибов, найденных в разных местах Украины, также отличалась между собой.

По результатам проведенных экспериментов нами исследованы динамика АОА биомассы и культуральной жидкости, определена величина и пределы варьирования антиоксидантной активности культуральной жидкости исследованных штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum*. Впервые установлена АОА для штаммов *G. applanatum*.

4.5. Исследование динамики роста и синтеза экзополисахаридов *Ganoderma applanatum* и *G. lucidum* на жидких средах

По результатам изучения питательных потребностей и скорости радиального роста Т.А. Круподеровой с соавт. (2007) из исследованных штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* были отобраны *G. applanatum* 1572 и *G. lucidum* 1621 для исследования их роста, синтеза экзополисахаридами на натуральных отходах: нативной молочной сыворотке производства ОАО «Яготинский маслозавод» (г. Яготин, Киевская обл.) и крахмальная крупка – отход производства ОАО «Кремнянский крахмальный завод» (с. Кремно, Житомирская обл.).

По данным исследователей (Бисько, 1983; Соломко, Дудка, 1985; Бухало, 1988; Гарибова, 2003; Wagner, 2004) известно, что условия глубинного культивирования обуславливают изменения морфологии культур. Для роста высших базидиомицетов Э.Ф. Соломко с соавт. (1981, 1985), а позднее и А.С. Бухало (1988) отмечают наличие в глубинной культуре нитчатого дисперсного роста или образование мицелиальных агломератов разных по размерам, плотности и форме (неправильной или шарообразной, от которой могут отходить разной длины одиночные гифы или гифальные пучки/тяжи). Так, в период активного роста культур *G. applanatum* 1572 и *G. lucidum* 1621 из мицелиальных нитей постепенно образовывались агломераты неправильной и правильной формы, которые не изменились и на 19-е сут культивирования. На срезах агломераты не имели клеточной дифференциации, мицелий сгруппировался в плотные образования.

Форма и размеры мицелиальных агломератов *G. applanatum*

1572 и *G. lucidum* 1621 изменялись в зависимости от питательной среды. Аналогичная закономерность для штаммов *G. lucidum* описана и другими исследователями (Гарибова и др., 2003).

В условиях глубинного культивирования *G. applanatum* 1572 на крупке образовывались пухлые агломераты, а на молочной сыворотке – гладкие и твердые. Для *G. lucidum* 1621 характерным было наличие агломератов с нитчатым ростом на поверхности. Агломераты, полученные на среде с крупкой, были твердее, чем те, что формировались на молочной сыворотке.

Размеры образованных на молочной сыворотке агломератов *G. lucidum* 1621 очень отличались от тех, которые были получены на крупке, и варьировали от 0,5 до 3 мм в диаметре. Эти размеры совпадают с результатами других исследователей (Lee et al., 1999; Fang, Zhong, 2002). Агломераты *G. applanatum* 1572, синтезированные на крупке, имели одинаковый размер.

Известно, что перемешивание влияет на структуру уже сформировавшихся шариков. Так, увеличение скорости вращения по данным Э.Ф. Соломко и В.В. Шашека (1984), способствует образованию мелких и компактных шариков, а медленное перемешивание – воздушных и рыхлых. Выявлено (Fang et al., 2002), что на размеры агломератов *G. lucidum* также влияют концентрация инокулюма и высокая концентрация глюкозы, а также внесение в питательную среду фосфата аммония в концентрации 5–11 г/л (Lee et al., 1999). Однако в нашем эксперименте интенсивность перемешивания и концентрация инокулюма были одинаковыми.

По данным ученых (Бисько, 1983; Соломко, Дудка, 1985; Бухало, 1988), формирование колоний в форме агломератов обусловлено рядом факторов: условиями культивирования (скоростью перемешивания, pH, составом питательной среды), взаимным действием мицелия и стенок культивационной посуды во время перемешивания, соотношением между частотой разветвления гиф и скоростью роста мицелия.

Полученные данные о динамике накопления биомассы *G. applanatum* 1572 и *G. lucidum* 1621 (рис. 4.2–4.5) на выбранных

питательных средах подчинялись общим закономерностям развития микроорганизмов в условиях периодической культуры. Выявлены также определенные различия: длительность фаз роста и синхронность динамики роста культур, образования полисахаридов.

Кривые роста *G. applanatum* 1572 при культивировании на крупке и *G. lucidum* 1621 – на молочной сыворотке почти с момента посева начинали подниматься вверх (рис. 4.3, 4.4). Количество массы мицелия обоих видов продолжало увеличиваться еще несколько суток, что соответствовало фазе активного роста культур.

На среде с молочной сывороткой лучше рос *G. lucidum* 1621, его средняя скорость накопления биомассы в активной фазе роста составила 5,6 г/л/сут (рис. 4.3), что было больше, чем в опубликованных в литературе данных (Ломберг, 2005; Смирнов, 2007; Fang, Zhong, 2002; Tang, Zhong, 2002, 2003; Wagner et al., 2004).

Однако при культивировании на питательной среде с крупкой этот штамм имел наименьшую среднюю скорость накопления биомассы – 0,95 г/л/сут (рис. 4.5), что совпадает с результатами, полученными другими исследователями (Tang, Zhong, 2002) в процессе роста *G. lucidum* на синтетической среде с лактозой (65 г/л), а также при выращивании на глюкозо-пептонной питательной среде (Бабицкая и др., 2007).

Штамм *G. applanatum* 1572 на обоих питательных средах имел почти одинаковую среднюю скорость образования биомассы: на молочной сыворотке – 2,05 г/л/сут (рис. 4.2), на среде с крупкой – 2,2 г/л/сут (рис. 4.4).

Типичная стационарная фаза роста, когда рост отдельных клеток еще продолжается, но процесс размножения уравнивается процессом гибели клеток, длилась 2 сут и наблюдалась у обеих исследованных культур только при культивировании на молочной сыворотке.

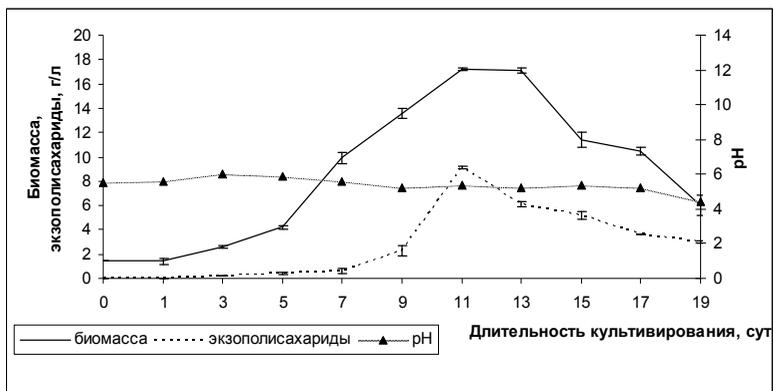


Рис. 4.2. Динамика роста, синтеза экзополисахаридов и pH среды при культивировании *Ganoderma applanatum* 1572 на молочной сыворотке

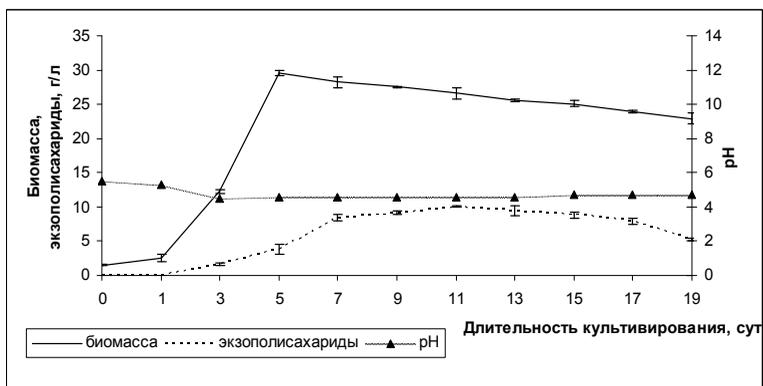


Рис. 4.3. Динамика роста, синтеза экзополисахаридов и pH среды при культивировании *Ganoderma lucidum* 1621 на молочной сыворотке

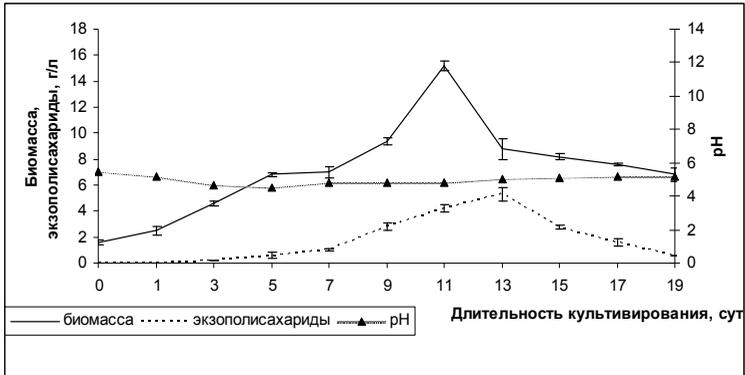


Рис. 4.4. Динамика роста, синтеза экзополисахаридов и pH среды при культивировании *Ganoderma applanatum* 1572 на среде с крахмальной крупкой

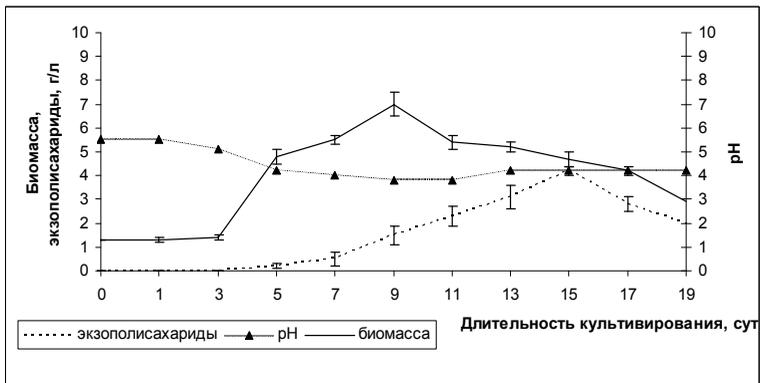


Рис. 4.5. Динамика роста, синтеза экзополисахаридов и pH среды при культивировании *Ganoderma lucidum* 1621 на среде с крахмальной крупкой

Причем у *G. applanatum* 1572 она начиналась на 11-е сут (рис. 4.2), а у *G. lucidum* 1621 – уже на 5-е сут эксперимента (рис. 4.3). Кривая роста обоих видов, за исключением *G. lucidum* 1621, при культивировании на молочной сыворотке после

достижения пика максимальной концентрации биомассы резко опускается вниз (рис. 4.2, 4.4, 4.5). С.М. Ждан-Пушкина (1983) считает, что это может быть обусловлено недостатком источника углерода, в то время как остальные компоненты среды, величина pH, температура и другие параметры остаются оптимальными для роста.

Установлено, что кривые динамики накопления мицелия и экзополисахаридов *G. lucidum* 1621 на выбранных средах не совпадали с результатами других исследователей (Бабицкая и др., 2007). В тоже время синхронность динамики роста и образования экзополисахаридов отмечены для периода культивирования *G. applanatum* 1572 на молочной сыворотке после 11 сут роста (рис. 4.2).

Известно, что величина биомассы и экзополисахаридов культур может сильно варьировать в зависимости от условий постановки, проведения экспериментов и биологических особенностей штаммов грибов. Так, согласно данным литературы (Ломберг, 2005; Бабицкая и др., 2007; Поєдинок та ін., 2007; Смирнов, 2007; Щерба, Бабицкая, 2008; Tang, Zhong, 2002; Fang, Zhong, 2002; Berović et al., 2003; Bisko et al., 2004; Liu, Zhang, 2006), разными штаммами *G. lucidum* синтезирована биомасса и экзополисахариды в количестве 2,3–22,1 г/л и 0,13–20,0 г/л соответственно. Молочная сыворотка была более благоприятной средой для накопления культурального мицелия (*G. applanatum* 1572–17,2±0,1 г/л на 11-е сут, *G. lucidum* 1621–29,6±0,4 г/л на 5-е сут) и экзополисахаридов (*G. applanatum* 1572–9,1±0,1 г/л на 11-е сут и *G. lucidum* 1621–10,0±0,1 г/л на 11-е сут) для обеих культур. Величина биомассы *G. applanatum* 1572, в отличие от *G. lucidum* 1621, на выбранных средах отличалась только на 1,3 г/л. Пик синтеза мицелиальной массы *G. applanatum* 1572 на крупке составил 15,2±0,4 г/л на 11-е сут, *G. lucidum* 1621–7,0±0,5 г/л – на 9-е сут эксперимента, максимальное количество экзополисахаридов – 5,3±0,5 г/л – было синтезировано *G. applanatum* 1572 на 13-е сут роста, а *G. lucidum* 1621–4,2±0,2 г/л – на 15-е сут (рис. 4.4, 4.5). Полученные показатели накопления биомассы и экзополисахаридов *G. applanatum* при культивировании на нативных отходах пищевой промышленности Украины выше, чем результаты, указанные в

литературе (Ломберг, 2005; Ahn et al., 2005). Данные о количестве экзополисахаридов (рис. 4.3, 4.5.), которые были синтезированы *G. lucidum* 1621 на выбранных средах, совпадают с литературными (Бабицкая и др., 2007; Смирнов, 2007; Wagner et al., 2004).

Результаты проведенных опытов подтверждают данные других ученых (Бисько и др., 1983; Капич и др., 1984; Лобанок и др., 1988) о перспективности молочной сыворотки в качестве субстрата для выращивания мицелия дереворазрушающих грибов. На нативной молочной сыворотке уже на 5-е сут роста нами получен урожай биомассы *G. lucidum* 1621 в количестве 28,1 г/л (рис. 4.3). Выход биомассы субстрата *G. lucidum* 1621 составил 46,8 г/л. С практической точки зрения последнее является принципиально важным показателем.

Таким образом, данные проведенных экспериментов подтверждают возможность использования отходов пищевой промышленности для глубинного культивирования мицелия грибов *G. applanatum* и *G. lucidum*. Полученные результаты показали, что штамм *G. lucidum* 1621 является биотехнологично перспективным объектом для получения биомассы и экзополисахаридов при культивировании на молочной сыворотке.

Список литературы

- Автономова А.В., Краснопольская Л.М., Завьялова Л.А.** Физиологические характеристики штаммов лекарственного базидиального гриба *Ganoderma lucidum* // Грибы в природных и антропогенных экосистемах / Тр. Междунар. конф., посвящ. 100-летию А.С. Бондарцева. – СПб., 2005. – С. 14-17.
- Автономова А.В., Белицкий И.В., Исакова Е.Б. и др.** Биотехнология получения и противоопухолевые свойства водорастворимых полисахаридов мицелия и плодовых тел *Ganoderma lucidum* // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии / Мат. Междунар. научн. конф. – Минск, 2006. – С. 244-246.
- Автономова А.В.** *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2006. – 24 с.

- Бабицкая В.Г., Хлюстов С.В., Пленина Л.В. и др.** Физиологически активные соединения и биологическое действие глубинного мицелия базидиомицета *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst // Биотехнология. – 2003. – **4**. – С. 35-44.
- Бабицкая В.Г., Бисько Н.А., Пленина Л.В.** *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.: состав глубинного мицелия, биологическое действие // Перспективы использования лекарственных грибов при решении медико-экологических проблем / Мат. Междунар. науч.-практ. конф. – Киев, 2004. – С. 8-14.
- Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А. и др.** Физиолого-биохимические свойства произрастающих в Беларуси штаммов *Ganoderma lucidum* // Усп. мед. микол. – 2006. – **7**. – С. 268-270.
- Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А.** Влияние условий глубинного культивирования лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* (рейши) на образование полисахаридов // Биотехнология. – 2007. – **6**. – С. 34-41.
- Бадалян С.М.** Противоопухолевая и иммуномодулирующая активность некоторых веществ из базидиальных макромицетов // Проблемы мед. микол. – 2000. – **2**, № 1. – С. 22-30.
- Билай В.И.** Основы общей микологии. – Киев: Вища шк., 1989. – 392 с.
- Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. и др.** Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. – Киев : Наук. думка, 1983. – 312 с.
- Бисько Н.А., Косман Е.Г.** Рост штаммов вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kuntt. на средах с различными источниками углерода и азота // Микол. фитопатол. – 1988. – **22**, № 6. – С. 516-519.
- Бухало А.С.** Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.
- Бухало А.С., Митропольская Н.Ю., Михайлова О.Б.** Каталог колекції культур шапинкових грибів ИБК. – К.: Альтпрес, 2011. – 100 с.
- Вассер С.П., Солдатова И.М.** Высшие базидиомицеты степной зоны Украины. – Киев: Наук. думка, 1977. – 355 с.
- Визначник грибів України.** – Киев: Наук. думка, 1971. – Т. 5. – 314 с.
- Ганбаров Х.Г.** Эколого-физиологические особенности дерево-разрушающих высших базидиальных грибов. – Баку: Элм, 1989. – 200 с.

- Гарибова Л.В., Антимонова А.В., Завьялова Л.А., Краснополяская Л.М.** Рост и морфологические признаки мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* в зависимости от условий культивирования // Микол. фитопатол. – 2003. – **37**, № 3. – С. 14-19.
- Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М.** Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. думка, 1973. – 591 с.
- Даниляк М.І., Решетников С.В.** Лікарські гриби. Медичне застосування та проблеми біотехнології. – Киев, 1996. – 65 с. – (Препринт / НАН України, Ін-т ботаніки ім. М.Г. Холодного, 1996).
- Денисова Н.П.** Лечебные свойства грибов: Этномикологический очерк. – СПб.: Изд-во СПб. ГМУ, 1998. – 59 с.
- Дудник Ю.В.** Перспективы создания препаратов, активных в отношении устойчивых форм бактерий // Антибиот. химиотер. – 1999. – **44**, № 12. – Р. 15-18.
- Ждан-Пушкина С.М.** Основы роста культур микроорганизмов. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1983. – 188 с.
- Жданова Н.Н., Василевская А.И.** Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. – Киев: Наук. думка, 1982. – 168 с.
- Завьялова Л.А., Автономова А.В., Гарибова Л.В., Краснополяская Л.М.** Штаммовые особенности чистых культур трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. // Соврем. микол. в России: Тез. докл. – М., 2002. – С. 147.
- Капич А.Н.** Антиокислительная активность экстрактов мицелия ксилотрофных базидиомицетов // Микол. и фитопатол. – 1995. – **29**, № 5/6. – С. 35-40.
- Капич А.Н.** Новый метод определения антиоксидантной активности // Усп. мед. микол. – 2007. – **9**. – С. 243-245.
- Капич А.Н., Стахеев И.В., Бабицкая В.Г.** Глубинное культивирование дереворазрушающих базидиальных грибов на молочной сыворотке // Микол. и фитопатол. – 1984. – **18**, № 6. – С. 478-483.
- Капич А.Н., Шишкина Л.Н.** Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов // Там же. – 1992. – **26**, № 6. – С. 486-492.
- Ковалева Г.К.** Биологические особенности и биохимический состав ксилотрофных базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. и *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2009. – 22 с.

- Коваленко А.Г.** Природные механизмы ограничения вирусных инфекций у растений и пути их практического использования // Итоги науки и техники. Защита растений. – 1983. – № 3. – С. 91-167.
- Коваленко А.Г.** Ингибирование системной индуцированной устойчивости растений к вирусам при погружении первично инокулированных листьев в воду // Микробиол. журн. – 1988. – **50**, № 4. – С. 62-68.
- Коваленко О.Г., Полищук О.М.** Вплив глюкуронооксиломану *Tremella mesenterica* Ritz: (Basidiomycota) на стійкість рослин до вірусу тютюнової мозаїки // Мікробіол. журн. – 2009. – **71**, № 1. – С. 50-56.
- Кожемякина Н.В., Гурина С.В., Афанасьева Е.П.** Углеводные компоненты *Ganoderma applanatum* и их противоопухолевая активность // Усп. мед. микол. – М.: Нац. акад. микологии, 2007. – Т. 9. – С. 164-165.
- Круподьорова Т.А.** Вплив кислотності поживного середовища на накопичення біомаси штамми лікарських грибів *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. та *G. lucidum* (Curt.) P. Karst. // Зб. наук. праць Луганськ. нац. аграр. ун-ту. Біол. науки. – 2008. – № 83. – С. 54-61.
- Круподьорова Т.А., Бісько Н.А.** Вплив температури на швидкість радіального росту та культурально-морфологічні особливості штамів лікарських грибів *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat. та *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. // Укр. бот. журн. – 2007. – **64**, № 6. – С. 875-884.
- Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П.** Ингибирующее действие фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на развитие инфекции, вызванной вирусом табачной мозаики в листьях двух сортов табака // Физиол. раст. – 2006. – **53**, № 2. – С. 274-279.
- Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П.** Действие фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на формирование ВТМ-специфических включений в клетках табака // Там же. – 2007. – **54**, № 1. – С. 127-130.
- Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н.** Микробный синтез на основе целлюлозы: белок и другие ценные продукты. – Минск: Наука и техника, 1988. – 261 с.
- Ломберг М.Л.** Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2005. – 20 с.

- Методы** экспериментальной микологии: Справочник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 583 с.
- Поєдинок Н.Л., Бабицька В.Г., Бісько Н.А.** Вплив умов глибинного культивування лікарського гриба *Ganoderma lucidum* (рейши) на біосинтез полісахаридів // Наук. вісті Нац. техн. ун-ту. – 2007. – № 2. – С. 92-100.
- Постнова Е.Л.** Антибиотическая активность и морфолого-культуральные признаки штаммов *G. lucidum* // Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции сообщества / Мат. юбил. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. М.В. Горленко. – М., 2008. – С. 194.
- Пучкова Т.А., Хлюстов С.В., Пленина Л.В. и др.** Иммунотропная активность глубинного мицелия базидиальных грибов // Мат. Междунар. конф. “Микробиология и биотехнология XXI столетия” (Минск, 22–24 мая 2002 г.). – Минск, 2002. – С. 68-69.
- Реунов А.В., Лапшина Л.А., Нагорская В.П., Елякова Л.А.** Подавление 1,3; 1,6-β-D-глюканом инфекций, вызванных х-вирусом картофеля, в листьях гофрены и дурмана // Физиол. раст. – 2000. – **47**, № 2. – С. 240-243.
- Рипачек В.** Биология дереворазрушающих грибов. – М.: Лес. пром., 1967. – 275 с.
- Ровбель Н.М., Пехтерова В.С., Соколова Т.В.** Влияние источников углеродного питания на сорбционную активность биомассы базидиомицетов *Ganoderma lucidum* и *Pleurotus ostreatus* // Микробиология и биотехнология XXI столетия / Мат. Междунар. конф. – Минск, 2002. – С. 71-72.
- Семенов В.Л., Ярош А.М.** Метод определения антиоксидантной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. – 1985. – **57**, № 3. – С. 50-52.
- Сироватка** молочна суха. Технічні умови : ДСТУ 4552:2006. – [Чинний від 2007-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2006. – 9 с. (Нац. стандарт України).
- Смирнов Д.А.** Углеводы глубинной культуры *Ganoderma lucidum*: образование, характеристика: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Минск, 2007. – 23 с.
- Смирнов Д.А., Пучкова Т.А., Щерба В.В., Бісько Н.А.** Физико-химические свойства полисахаридов *Ganoderma lucidum* // Современное состояние и перспективы развития микробиологии

- и биотехнологии / Мат. Междунар. научн. конф. – Минск, 2006. – С. 177-179.
- Соломко Э.Ф.** Синтетическая среда для культивирования *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. – Киев, 1992. – 22 с.
- Соломко Э.Ф.** Грибы как физиологически функциональный пищевой продукт и источник фармакологически активных лекарственных веществ // Перспективы использования лекарственных грибов при решении медико-экологических проблем / Мат. Междунар. наук.-практ. конф. – Киев, 2004. – С. 70-80.
- Соломко Э.Ф., Дудка И.А.** Перспективы использования высших базидиомицетов в микробиологической промышленности. Обзор. информ. – М.: ВНИИСЭНТИ, 1985. – 48 с.
- Соломко Э.Ф., Митропольская Н.Ю.** Получение посевного материала *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. глубинным методом // Микол. и фитопатол. – 1994. – **28**, № 3. – С. 34-39.
- Соломко Е.Ф., Шашек В.** Удосконалення методики вивчення фізіології та кінетики росту *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. у глибинній культурі // Укр. бот. журн. – 1984. – **41**, № 4. – С. 82-85.
- Соломко Э.Ф., Бухало А.С., Митропольская Н.Ю.** Лекарственные свойства базидиальных макромицетов // Проблеми експериментальної ботаніки та екології рослин: Зб. наук. праць. – Киев: Наук. думка, 1997. – 1. – С. 156-167.
- Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю.** Ріст окремих видів лікарських макромицетів на живильних середовищах різного складу // Укр. бот. журн. – 2000. – **57**, № 2. – С. 119-126.
- Соломко Э.Ф., Сумневич В.Г., Пчелинцева Р.К., Пархоменко Л.П.** Влияние условий глубинного культивирования на рост и химический состав мицелия съедобного гриба *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. ИМВФ-1300 // Микол. фитопатол. – 1981. – **154**, № 3. – С. 217-222.
- Степаненко В.В.** Ганодерма – сокровище восточной фитотерапии // Фітотер. в Україні. – 1998. – № 2/3. – С. 48-50.
- Филимонова Т.В., Трухоневец В.В., Пучкова Т.А. и др.** Морфолого-культуральные особенности грибов рода *Lentinus*, *Ganoderma*, *Crinipellis* // Микробиология и биотехнология XXI столетия / Мат. Междунар. конф. – Минск, 2002. – С. 108-109.
- Цизь А.М., Бисько Н.А.** Рост мицелия лекарственных грибов порядка

- Aphylophorales на различных средах // Усп. мед. микол. – М.: Нац. акад. микол., 2007. – Т. 9. – С. 266-268.
- Шиврина А.Н.** Биосинтетическая деятельность высших грибов. – Л.: Наука, 1969. – 243 с.
- Шишкина Л.Н., Капич А.Н.** Антиоксидантная активность липидов ксилотрофных базидиомицетов // Усп. мед. микол. – М.: Нац. акад. микол., – 2006. – Т. 7. – С. 262-263.
- Щерба В.В., Бабицкая В.Г.** Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – **44**, № 1. – С. 90-95.
- Adaskaveg J.E., Gilberston R.L.** Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex // Mycologia. – 1986. – **78**, N 5. – P. 694-705.
- Adaskaveg J.E., Gilberston R.L.** Basidiospores, pileocystidia and other basidiocarp characters in several species of the *Ganoderma lucidum* complex // Ibid. – 1988. – **80**, N 4. – P. 493-507.
- Ahn J.K., Lee W.Y., Park U., Park S.Y.** Submerged culture conditions for the production of exo- and endopolysaccharides by *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. // Intern. J. Med. Mushr. – 2005. – **7**, N 3/4. – P. 370.
- Anke T.** Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites from microorganisms. – Amsterdam: Elsevier, 1989. – 125 p.
- Asatiani M.D., Elisashvili V., Wasser S.P.** Antioxidant activity of submerged cultured mycelium extracts of higher basidiomycetes mushrooms // Intern. J. Med. Mushr. – 2007. – **9**, N 2 – P. 151-58.
- Babitskaya V.G., Scherba V., Mitropolskaya N.Y., Bisko N.A.** Exopolysaccharides of some medicinal mushrooms: production and composition // Ibid. – 2000. – **2**, N 1. – P. 51-54.
- Badalyan S.M., Gasparyan A.V.** Antioxidant activity of several basidiomycete mushrooms cultures // The 7th Intern. Mycol. Congr. Abstracts. – Oslo, 2002. – P. 304.
- Badalyan S.M., Sakeyan C.Z.** Morphological, physiological, and growth characteristics of mycelia of several wood – decaying medicinal mushrooms (Aphylophoromycetideae) // Intern. J. Med. Mushr. – 2004. – **6**, N 4. – P. 347-360.
- Badalyan S.M., Sakeyan C.Z.** Study of mitogenic effect of mycelia of several aphylophoromycetideae medicinal mushrooms // Sixth Intern. Conf. on Mushr. Biol. and Mushr. Products. – Bonn, 2008. – P. 79.
- Bao X.-F., Wang X.-S., Dong Q. et al.** Structural features of immuno-

- logically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum* // Phytochemistry. – 2002. – **59**. – P. 175-181.
- Bazzalo M.E., Wright J.E.** Survey of the argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex // Mycotaxon. – 1982. – **16**, N 1. – P. 293–325.
- Berdy J.** Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. – 2005. – **58**, N 1. – P. 1-26.
- Berovič M., Habijanič J., Zore I. et al.** Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides // J. Biotechnol. – 2003. – **103**. – P. 77-86.
- Bisko N.A., Bilay V.T., Babitskaya V.G. et al.** Biologically active substances from mycelial of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* // Science and cultivation of edible and med. fungi: Proc. of the 16th Intern. Congr. – Miami, 2004. – P. 619-623.
- Boh B.** Pharmaceutically active compounds from *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma lucidum* from European habitat // The 7th Intern. Mycol. Congr. Abstracts. – Oslo, 2002. – P. 111-120.
- Boh B., Berovič M., Wraber B. et al.** *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd and *G. applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllphoromycetideae) from Slovenian habitats: cultivation, isolation, and testing of active compounds // Intern. J. Med. Mushr. – 2004. – **6**, N 1. – P. 15–32.
- Chang M.-Y., Tsai G.-J., Houg J.-Y.** Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method // Enz. Microbiol. Technol. – 2006. – **38**. – P. 407-414.
- Chang R.Y.** Potential application of *Ganoderma* polysaccharides in the immune surveillance and chemoprevention of cancer // Mushr. Biol. and Mushr. Products: Proc. of the 2nd Intern. Conf. – Penn. State, 1996. – P. 153-157.
- Chang S.-T.** Mushroom biology: the impact on mushroom production and mushroom products // First Intern. Conf. on Mushr. Biology and Mushr. Products. – Hong Kong, 1993. – 36 p.
- Chang S.-T.** Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – **1**, N 1. – P. 1-7.
- Chang S.-T., Buswell J.A.** *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae) – a mushrooming medicinal mushroom // Ibid. – N 2. – P. 139-146.

- Chen A.W.** Cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Reishi) in North America // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – 1, N 3. – P. 263-282.
- Chang S.-T., Hayes W.A.** The biology and cultivation of edible mushrooms. – London: Acad. Press, 1978. – 819 p.
- Chang S.-T., Miles P.G.** Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact.– London; New York; Washington: CRC Press, 2004. – 450 p.
- Chen A.W., Miles P.G.** Biomedical research and the application of mushroom nutraceuticals from *Ganoderma lucidum* // Mushr. Biology and Mushr. Products: Proc. of the 2nd Intern. Conf. – Penn. State, 1996. – P. 161-175.
- Chen A.W., Seleen J., Babcock G.** Evidence-based potential benefits of *Ganoderma lucidum* // Ibid. – 2007. – 9, N 3/4. – P. 289-290.
- Chen A.W., Seleen J.S., Babcock G.** Surging interest in antiviral activity in mushrooms // Sixth Intern. Conf. on Mushr. Biol. and Mushr. Products. – Bonn, 2008. – P. 82.
- Chen H.-S., Tsai Y.-F., Lin S. et al.** Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides // Bioorg. Med. Chem. – 2004. – 12. – P. 5595–5601.
- Chen N.-H., Zhong J.-J.** Ganoderic acid T from a traditional Chinese medicinal herb induces cell cycle arrest and P 53 expression, down-regulates MMP2/9, and inhibits tumor cell invasion and metastasis // J. Biotechnol. – 2008. – 136. – P. 97-98.
- Chen R.-Y., Yu D.-Q.** Studies on the triterpenoid constituents of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae) // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – 1, N 3. – P. 147-152.
- Choong Y.K., Noordin M.M., Mohamed S. et al.** The nature of apoptosis of human breast cancer cells induced by three species of genus *Ganoderma* P. Karst. (Aphyllophoromycetidae) crude extracts // Ibid. – 2008. – 10, N 2.– P. 115-125.
- Chu Q.-P., Wang L.-E., Cui X.-Y. et al.** Extract of *Ganoderma lucidum* potentiates peptobarbital-induced via a GABSergeric mechanism // Pharm. Biochem. Behar. – 2007. – 86. – P. 693-698.
- Chung W.T., Lee S.H., Kim J. D. et al.** Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines // J. Biosci. Bioeng. – 2001. – 92, N 6. – P. 550-555.

- Elgorashi E.E., Maekawa N., Satoh H.** In vitro anti-inflammatory activity of selected Japanese higher Basidiomycetes mushrooms // Intern. J. Med. Mushr. – 2008. – **10**, N 1. – P. 49-53.
- Dighe S., Agate A.D.** Antibacterial activity of some Indian mushrooms // Intern. J. Med. Mushr. – 2002. – **2**, № 2. – P. 141-150.
- Elisashvili V., Wasser S., Tan K.-K.** Extracellular polysaccharide production by culinary-medicinal Shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer and *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. species. Depending of Carbon and Nitrogen Source // Ibid. – 2004. – **6**, N 2. – P. 165-172.
- Fan H., Zhang J., Tang Q. et al.** Immune stimulatory activity of GLIS: a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum* // Sixth Intern. Conf. on Mushr. Biol. and Mushr. Products (Bonn, 29 Sept. – 3 Oct., 2008). – Bonn, 2008. – P. 62.
- Fang Q.-H., Zhong J.-J.** Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide // Process Biochem. – 2002. – **10**. – P. 61-65.
- Fang Q.-H., Nang Y.-J., Zhong J.-J.** Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* // Ibid. – 2002. – **37**. – P. 1375-1379.
- Fu Y.-J., Liu W., Zu Y.-G. et al.** Breaking the spores of the fungus *Ganoderma lucidum* by supercritical CO₂ // Food Chem. – 2009. – N 112. – P. 71-72.
- Furtado J.S.** Relation of microstructures to the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the pilear surface // Mycologia. – 1965. – **57**. – P. 588-611.
- Gadd G.M.** Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes // Adv. Microb. Physiol. – 1999. – **41**. – P. 47-92.
- Gao J.-J., Min B.-S., Ahn E.-M. et al.** New triterpene aldehydes, lucialdehydes A–C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells // Chem. Pharmacol. Bull. – 2002a. – **50**, N 6. – P. 837-840.
- Gao Y., Zhou S., Chen G., Dai X., Ye J.** A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. extract (Ganopoly) in patients with advanced cancer // Intern. J. Med. Mushr. – 2002b. – **4**, N 3. – P. 207-214.

- Gao Y., Zhou B S., Chen G. et al.** A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) extract in patients with chronic hepatitis // Intern. J. Med. Mushr. – 2002c. – **4**, N 4. – P. 321-328.
- Gao Y., Zhou S., Huang M., Xu A.** Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. species (Aphyllphoromycetidae): a review // Ibid. – 2003. – **5**, N 3. – P. 235-246.
- Gao Y., Zhou S.** Chemopreventive and tumoricidal properties of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae). Part I. Mechanism considerations (review) // Ibid. – 2004a. – **6**, N 2. – P. 95-106.
- Gao Y., Zhou S.** Chemopreventive and tumoricidal properties of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae). Part II. Mechanism considerations (review) // Ibid. – 2004b. – **6**, N 3. – P. 219-230.
- Gerber A.L., Junior A.S., Monache F.D. et al.** Triterpenes and sterols from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (Aphyllphoromycetidae) // Ibid. – 2000. – **2**, N 4. – P. 303–311.
- Griensven L.** Mushrooms: cause and cure // Sixth Intern. Conf. on Mushr. Biol. and Mushr. Products. – Bonn, 2008. – P. 33.
- Ghorashi S., Bucke C., Keshavarz T.** Isolation of biologically compounds from *Ganoderma* sp. // BioThailand 2003: Technology for life. Abstr. (Peach, Pattaya 17–20 July 2003). – Peach, Pattaya, 2003. – P. 189–195.
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J. et al.** A higher-level phylogenetic classification of the fungi // Mycol. Res. – 2007. – **3**, N 5. – P. 509-547.
- Hobbs Ch.** Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture. – Santa Cruz: Bot. Press, 1996. – 251 p.
- Hong S.G., Jung H.S.** Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences // Mycologia. – 2004. – **96**, N 4. – P. 742-755.
- Jones K.** Reishi. Ancient herb for modern times. – Washington: Sylvan Press, 1990. – 34 p.
- Jones S., Janardhanan K.K.** Antioxidant and antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt. : Fr.) P. Karst. – Reishi (Aphyllphoromycetidae) from South India // Intern. J. Med. Mushr. – 2000. – **2**, N 3 – P. 195-200.

- Kim H.W., Kim B.K.** Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetideae) // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – **1**, N 2. – P. 121-139.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C.** Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. – UK, Wallingford; Oxon: CABI Publ., 2001. – 655 p.
- Ko H.-H., Hung C.-F., Wang J.-P., Lin C.-N.** Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae* // Phytochemistry. – 2008. – **69**. – P. 234-239.
- Kopp M., Rouster J., Fritig B., Darvill A., Albersheim P.** Host-pathogen interactions. XXXII. A fungal glucan preparation protects nicotiana against infection by viruses // Plant Physiol. – 1989. – **90**. – P. 208-216.
- Kvasko E., Krupodorova T.** Antioxidant activity of medicinal mushrooms *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) P. Karst. and *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst strains // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution / Mat. of III Intern. Young Sci. Conf. – Odessa, 2007. – P. 90-91.
- Lee K.-M., Lee S.-Y., Lee H.-Y.** Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermenter // J. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **9**, N 6. – P. 726-731.
- Lee S.-S., Lee P.-L., Chen C.-F.** Antitumor effects of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) (Aphyllorphomycetideae) // Intern. J. Med. Mushr. – 2003. – **5**, N 1. – P. 1-16.
- Lehmkuhl G.A., Junior A.S., Monache F.D. et al.** Triterpenes and sterols from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (Aphyllorphomycetideae) // Ibid. – 2000. – **2**, N 4. – P. 303-311.
- Lei Z., Zheng-Dong Z., Ji-Yun T.** Effect of Selenium on the nutritional components of *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd // Ibid. – 2005. – **7**, N 3-4. – P. 428.
- Li Y.-B., Liang C.-X., Liu R.-M., Zhong J.J.** Simultaneous determination of four triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by reversephase highperformance liquid chromatographydiode array detector // J. Biotechnol. – 2008. – **136**. – P. 43.
- Linghong Y., Huailing W., Genstao L.** The hypnotic and sedative actions of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetideae) in mice // Intern. J. Med. Mushr. – 2000. – **2**, N 4. – P. 323-328.

- Litchfield J.H.** Recent development: Submerged culture of morel mushroom mycelium // Food Technology. – 1967. – **21**, N 2. –P. 55-57.
- Liu G.-T.** Recent Advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* P. Karst. species (Aphyllophoromycetideae) in China // Intern. J. Med. Mushr. – 1999a. – **1**, N 1. – P. 63-67.
- Liu G.-T.** Pharmacology and clinical application of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curtis. : Fr.) P. Karst. and mycelium of *G. capence* (Lloyd) Teng. (Aphyllophoromycetideae) // Ibid. – 1999b. – **1**, N 3. – P. 217-222.
- Liu J., Shimizu K., Konishi F. et al.** The anti-androgenic effect of *Ganoderma lucidum* // Science and cultivation of edible fungi: Proc. of the 16th Intern. Conf. – Mexico, 2004. – P. 645-652.
- Liu G.-T., Zhang K.-C.** Effect of water and ethanol extracts of insects on polysaccharide production by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* // Mycosystems. – 2006. – **25**, N 2. – P. 308-315.
- Liu J., Shimizu K., Konishi F.** Anti-androgenic activities of triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum* // Food Chem. – 2007. – **100**. – P. 1691-1696.
- Loewus F.A.** Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi // Phytochemistry. – 1999. – **52**. – P. 193-210.
- Ma C., Guan S.-H., Yang M., Liu X., Guo D.-A.** Differential protein expression in mouse splenic mononuclear cells treated with polysaccharides from spores of *Ganoderma lucidum* // Phytomedicine. – 2008. – **15**. – P. 268-276.
- Mizuno T.** The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review) // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – **1**, N 1. – P. 9-29.
- Mizuno T., Sakamura S.** Food and medicinal properties of *Ganoderma lucidum* // Chem. Biol. – 1995a. – **23**. – P. 797–802.
- Mizuno T., Sakamura S.** Reishi, *Ganoderma lucidum* and Ganodermatales: bioactive substances and medicinal effects // Food Rev. Intern. – 1995b. – **60**. – P. 151-166.
- Molitoris H.P.** Fungi: companions of man in good and evil // Intern. J. Med. Mushr. – 2005. – **7**, N 1 – P. 49-73.
- Moncalvo J.-M.** Molecular systematics of *Ganoderma*: What is Reishi?// Ibid. – 2005. – **7**, N 3. – P. 353–354.

- Moncalvo J.-M., Wang H.-F., Hseu R.-S.** Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences // *Mycologia*. – 1995a. – **87**, N 2. – P. 223.
- Moncalvo J.-M., Wang H.-F., Hseu R.-S.** Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional characters // *Mycol. Res.* – 1995b. – **99**, N 12. – P. 1489-1499.
- Moradali M.-F., Mostafavi H., Ghods S., Hejaroude G.-A.** Immunomodulating and anticancer agent in the realm of macromycetes (macrofungi) // *Intern. Immunopharm.* – 2007. – N 7. – P. 701-724.
- Nobles M.K.** Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes // *Can. J. Bot.* – 1965. – **43**. – P. 1097-1139.
- Ooi V.E. C., Fang L.** A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides // *Intern. J. Med. Mushr.* – 1999. – **1**, N 3. – P. 195-206.
- Pegler D.N.** Useful fungi of the world: the Ling-zhi – the mushroom of immortality // *Mycologist*. – 2002. – **16**. – P. 100-102.
- Perreau J.** Contribution à l'étude des ornements sporaux chez les *Ganodermes* // *Review de Mycologia*. – 1973. – N 37. – P. 241-252.
- Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K.** Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (review) // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2001. – **3**, N 4. – P. 361-394.
- Roberts L.M., Crawford R.J., Lonergan G.T.** Extraction of bioactive compounds from the liquid culture of an Australian *Ganoderma* P. Karst. species using a range of polarity solvents // *Ibid.* – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 212.
- Ronhier P., Kopp M., Begot V. et al.** Structural features of fungal β -D-glucans for the efficient inhibition of the initiation of virus infection on *Nicotiana tabacum* // *Phytochemistry*. – 1995. – **39**. – P. 57-62.
- Rubel R., Santa H.S.D., Fernandes L.C. et al.** High immuno-modulatory and preventive effects against sarcoma 180 in mice fed with Ling Zhi or Reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt. Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae) mycelium // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2008. – **10**, N 1. – P. 37-48.
- Russel R., Paterson M.** *Ganoderma* – a therapeutic fungal biofactory // *Phytochemistry*. – 2006. – **67**. – P. 1985-2001.
- Ryvarden L., Gilberston R.L.** European Polypores. Synop. Fung. – Oslo: Fungiflora. – 1993. – 282 p.
- Sabotič J., Trček T., Popovič T., Brzin J.** Basidiomycetes harbour a hidden

- treasure of proteolytic diversity // J. Biotechnol. – 2007. – **128**. – P. 29-302.
- Semerdzheva M., Veselský J.** Léčivé houby dříve a nyní. – Praha: Academia, 1986. – 177 s.
- Shah N.R.** Ganoderma lucidum: a novel addition to modern medicine // Proc. of the 16th Intern. Congr. „Science and cultivation of edible and medicinal fungi“ (Miami, 14–17 March 2004). Abstracts. Penn. State. – Miami, 2004. – P. 653-658.
- Smania A., Monache D.L., Loquerciolei C. et al.** Antibacterial activity of basidiomycetes // Intern. J. Med. Mushr. – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 87.
- Smith J.E., Sullivan R., Rowan N.** The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: current perspectives (review) // Ibid. – 2003. – **5**, N 3. – P. 217-234.
- Soo T.S.** Effective dosage of the extract of *Ganoderma lucidum* in the treatment of various ailments // Mushr. Biol. y and Mushr. Products / Proc. of the 2nd Intern. Conf. – Penn. State, 1996. – P. 177-184.
- Sornprasert R., Sangsuwan Y.** Effect of grude extract from mycelia of *Ganoderma lucidum* against the bacterial growth // BioThailand 2003: Technology for life. Abstracts. – Oslo, 2003. – P. 307-310.
- Stalpers J.A.** Identification of wood-inhabiting Aphylophorales in pure culture // Stud. Mycol. – 1978. – **16**. – 248 p.
- Stamets P.** Growing gourmet and medicinal mushrooms. – Hong Kong: Ten Speed Press, 2000. – 574 p.
- Stamets P.** Notes on nutritional properties of culinary-medicinal mushrooms // Intern. J. Med. Mushr. – 2005. – **7**, N 3. – P. 103-110.
- Steyaert R.L.** Basidiospores of two *Ganoderma* species and others of related genera under the scanning electron microscope // Kew Bull. – 1977. – N 31. – P. 437-442.
- Tang Y.-J., Zhong J.-J.** Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid // Enz. Microbiol. Technol. – 2002. – **31**. – P. 20-28.
- Tang Y.-J., Zhong J.-J.** Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production polysaccharide and ganoderic acid // Ibid. – 2003. – **32**. – P. 478-484.
- Tsvetkova I., Naydenski H., Petrova A. et al.** Antibacterial activity of some Bulgarian higher Basidiomycetes mushrooms // Intern. J. Med. Mushr. – 2006. – **8**, N 1. – P. 63-66.

- Wagner R., Mitchell D., Sasaki G.** Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides // Food Technol. Biotechnol. – 2003. – **41**, N 4. – P. 371-382.
- Usui T., Iwasaki Y., Mizuno T.** Isolation and characterization of antitumor active β -D-glucans from fruit bodies of *Ganoderma applanatum* // Carbohydr. Res. – 1983. – N 115. – P. 273-280.
- Vaidya J.G., Bhosle S., Deshpande G.** Taxonomy of the genus *Ganoderma* P. Karst.: adulterant of phansombe and a few wild collections causing root in plantation trees // Intern. J. Med. Mushr. – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 237.
- Wagner R., Mitchell D.F., Sasaki G.L. et al.** Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide // J. Biotechnol. – 2004. – **114**. – P. 153-164.
- Wang Y.-Y., Khoo K.-H., Chen S.-T. et al.** Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities // Bioorg. Med. Chem. – 2002. – **10**. – P. 1057-1062.
- Wasser S.P.** Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – **60**. – P. 258-274.
- Wasser S.P.** Medicinal mushrooms: ancient traditions, contemporary knowledge, and scientific enquiries // Intern. J. Med. Mushr. – 2007. – **5**, N 3-4. – P. 187-188.
- Wasser S.P., Weis A.L.** Medicinal mushrooms *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. (Reishi mushrooms). – Haifa; San Antonio; Kyiv, 1997. – 39 p.
- Wasser S.P., Weis A.L.** Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review) // Intern. J. Med. Mushr. – 1999a. – **1**, N 1. – P. 31-62.
- Wasser S.P., Weis A.L.** Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective // Crit. Rev. Immunol. – 1999b. – **19**. – P. 65-96.
- Wasser S.P., Didukh M.Y., Nevo E.** Antitumor and immuno-modulatory activities of medicinal mushroom polysaccharides and polysaccharide-protein complexes in animal and humans (review) // Mycol. Balcan. – 2005. – **2**. – P. 221-250.

- Wasser S.P., Elisashvili V.I., Tan K.-K.** Effects of carbon and nitrogen sources in the medium on *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. (Heterobasidiomycetes) growth and polysaccharide production // Intern. J. Med. Mushr. – 2003. – **5**, N 1. – P. 49-56.
- Wasser S.P., Nevo E., Sokol D. et al.** Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations // Intern. J. Med. Mushr. – 2000. – **2**, N 1. – P. 1-20.
- Wasser S.P., Zmitrovich I.V., Didukh M.Ya. et al.** Morphological trains of *Ganoderma lucidum* complex. Highlighting *G. tsudae* var. *jannieae*: the current generalization. – Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.C., 2006. – 187 p.
- Willard T.** Reishi mushroom. Herb of spiritual potency and medical wonder. – Washington : Sylvan Press, 1990. – 167 p.
- Yang B.-K., Jong S.-C., Park J.-B. et al.** The hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. WK-003 exo- and endo-polymers produced by submerged mycelial culture // Intern. J. Med. Mushr. – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 248.
- Yeh Z., Chen Z., Kimbrough J.W.** *Ganoderma australe* from Florida // Mycotaxon. – 2000. – **85**. – P. 233-240.
- Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q.** Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity // Trends Food Sci. Technol. – 2007. – **18**. – P. 4-19.
- Zhang J., Fan H., Reutter W.** Effect of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. and *Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quel. on immunostimulation and inhibition on tumor growth // Intern. J. Med. Mushr. – 2001. – **3**, N 2/3. – P. 257.
- Zhang Q.-V., Liu Z.-B.** The antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst (Ling Zhi) (Aphyllporomycetideae) polysaccharides is related to tumor necrosis factor- α and interferon- γ // Ibid. – 1999. – **1**, N 3. – P. 207-217.
- Zhou S., Gao Y.** The immunomodulating effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P.Karst (Ling Zhi, Reishi mushroom) (Aphyllporomycetideae) // Ibid. – 2002. – **4**, N 1. – P. 1-12.
- Ziegenbein F.C., Hanssen H.-P., König W.A.** Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomalleus* // Phytochemistry. – 2006. – **67**. – P. 202-211.

СОДЕРЖАНИЕ

СУМЧАТЫЕ ГРИБЫ РОДА <i>MORCHELLA</i> DILL. <i>О.Б. Михайлова, А.С. Бухало</i>	3
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ СЪЕДОБНЫХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ <i>В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.А. Пучкова, Н.А. Бисько</i>	76
РОСТ КУЛЬТУР МАКРОМИЦЕТОВ НА АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ И ПЛОТНЫХ СУБСТРАТАХ <i>М.Л. Ломберг, Э.Ф. Соломко</i>	345
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА ВИДОВ РОДА <i>GANODERMA</i> P. KARST. <i>Т.А. Круподерова, Н.А. Бисько</i>	372

Наукове видання

АВТОРИ:

**Бісько Н.А., Бабицька В.Г., Бухало А.С., Круподерова Т.А.,
Ломберг М.Л., Михайлова О.Б., Пучкова Т.А., Соломко Э.Ф.,
Щерба В.В.**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ
МАКРОМИЦЕТОВ В КУЛЬТУРЕ**

Збірник наукових праць у двох томах

Том 2

Під ред. чл.-кор. НАН України С.П. Вассера

(роїською мовою)

Редактор Несчетна В.В.

Технічний редактор Алейнікова М.Д.

Підписано до друку 16.01.2012. Формат 84x108/32. Папір офс.

Гарнітура Mugiad Pro. Друк офс. Умов. друк. арк. 12,24.

Обл. вид. арк. 12,2. Тираж 300 прим. Замовлення №