

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И УСЛОВИЙ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫРАЩИВАНИЯ СТЕРЕУМА ЖЕСТКОВОЛОСИСТОГО (*STEREUM HIRSUTUM*)

Калько Е.И.

Калько Елена Ивановна – аспирант,
кафедра биотехнологии,

Полесский государственный университет, г. Пинск, Республика Беларусь

УДК: 60:582.284

В течение многих столетий грибы используются в народной медицине стран Юго-Восточной Азии, а в настоящее время благодаря уникальным лечебным свойствам приобретают все большую популярность в США и Европе [1]. Перспективными источниками для получения новых лечебно-профилактических препаратов являются грибы рода *Стереум* (*Stereum*). Наиболее известным представителем этого рода является стереум жестковолосистый (*Stereum hirsutum*). Входящие в состав этих грибов соединения проявляют высокую противоопухолевую, иммуностимулирующую, гепатопротекторную, антиоксидантную, антимикробную и противовирусную активности. В природе грибы рода *Stereum* встречаются в небольшом количестве, так как имеют малых размеров плодовое тело, поэтому в настоящее время для получения препаратов на их основе используется мицелий, полученный биотехнологическим путем [2]. Наиболее распространено твердофазное культивирование этих грибов. Перспективным способом получения биомассы и метаболитов грибов рода *Stereum* является глубинное культивирование, позволяющее за короткое время получать стандартные продукты с заданными свойствами.

Для глубинного культивирования грибов используются полусинтетические питательные среды, при этом биологически активные соединения могут образовываться не только в мицелии, но и в культуральной жидкости [3]. Однако физиологические потребности грибов рода *Stereum*, а также их способность продуцировать биологически активные вещества, при глубинном культивировании на жидких питательных средах изучены недостаточно. В то же время, влияние биологически активных соединений гриба *S. hirsutum* на живой организм, его антиоксидантный статус, неспецифическую резистентность, обмен веществ, сохранность и продуктивные качества до сих пор остается малоизученным.

Большой интерес представляет разработка антиоксидантных субстанций на основе грибов рода *Stereum*, включающей культуральный мицелий и культуральную жидкость этих грибов. В связи с этим выдвигаются определенные требования к составу питательных сред для культивирования грибов рода *Stereum*. При оптимизации питательных сред для глубинного культивирования грибов *S. hirsutum* следует использовать компоненты, которые поддерживают активный рост мицелия и продуцирование биологически активных веществ, и которые при этом не представляют потенциальной опасности для живого организма.

В научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии на базе УО «Полесский государственный университет» проводятся научно-исследовательские работы с культурами грибов рода *Pleurotus*, [3, 4], с 2017 года в данной лаборатории ведется работа с культурой гриба рода *Stereum* (*S. hirsutum*) [5-7].

Цель исследования – подбор экономически выгодных питательных сред и условий глубинного культивирования *S. hirsutum* для достижения наибольшей урожайности.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на штамме *S. hirsutum*, выделенном аспирантом Е.И. Калько, под руководством Е.О. Юрченко доцентом кафедры биотехнологии, в 2017 г. из плодовых тел, растущих на поврежденном дереве в г. Пинске [5, 6].

В нашей работе для глубинного культивирования были выбраны две питательные среды. Для питательной среды № 1 применялся ржаной сухой неферментированный солод ГОСТ 29272. Приготовление среды № 1: 200 г/л солода разводили с 3 л водопроводной воды, настаивали сутки, перемешивали несколько раз в течение настаивания, фильтровали и добавляли воду до 1л, рН 5,0-5,5 [8].

Для картофельно-сахарозной среды (питательная среда № 2) использовали картофель сорта Скарб и пищевую сахарозу ГОСТ 21-94. Для приготовления питательной среды № 2 нарезанные клубни картофеля, ломтиками 3-4 мм, отваривали в течение 20 мин, после кипения, отвар фильтровали, объем фильтрата доводили до 1л, добавляли сахарозу (400 г/л картофельного отвара, 30 г/л сахарозы), рН 5,0-6,0 [6].

Среду № 1 и № 2 разливали в стерильные стеклянные колбы объемом 500 мл по 200 мл, в колбах с ватно-марлевыми пробками стерилизовали, в автоклаве 12°C, 40 мин.

Все работы с культурой клеток *in vitro* в лаборатории проводили в стерильных условиях. Перед экспериментом в помещении все поверхности омывались дезинфицирующим раствором, включали

ультрафиолетовое облучение помещения на 36 мин за 60 мин до работы. Необходимая лабораторная посуда, инструменты подвергали стерилизации в сухожаровом шкафу при температуре 180°C в течение 60 мин. Инструменты при каждой манипуляции помещали в сосуд с 96°C этиловым спиртом, затем прожигали в пламени горелки, каждый инструмент использовали одноразово. Эксперимент проводим в ламинарном боксе. Пробирку с маточной культурой *S. hirsutum* берем в левую руку на ладонь параллельно расположению пальцев и придерживаем большим пальцем так, чтобы скошенная поверхность среды была хорошо видна. В правую руку как ручку для писания берем инокуляционную иглу и несколько раз проводим ее над пламенем горелки для стерилизации. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки вынимаем пробку из пробирки с маточной культурой и осторожно, по стенке, для охлаждения, вводим инокуляционную иглу и берем инокулюм в виде фрагментов ковра мицелия площадью 1 см², вырезаемый вместе с тонким слоем среды около 1 мм толщиной. Края пробирки и пробки проводим через пламя горелки для стерилизации и пробирку с культурой закрываем пробкой. Агаровый блок с мицелием пересеваем в стерильную, жидкую питательную среду № 1; № 2, температура среды 19±1°C.

На накопление биомассы большое влияние оказывает процесс доставки питательных веществ, к клеточной стенке, который обеспечивается процессом перемешивания, поэтому исходя из биологических и морфологических свойств культуры *S. hirsutum* эксперимент проводили при постоянном перемешивании культуры (на качалке WiseShakeSHO при скорости перемешивания 70 об./мин) мицелий культивировали в течение трех недель в темноте, в термостат при температуре 27±1°C. Полученный результаты обрабатывали в программе «Statistika 6».

Результаты и их обсуждение. При выборе лабораторных питательных сред особое внимание уделялось не только накоплению биомассы, но и скорости роста культуры. Исследовано влияние компонентов питательных сред и условий культивирования на рост гриба *S. hirsutum*. Эксперимент выполнен в семикратной повторности. В таблице 1 показаны результаты глубинного культивирования стереума жестковолосистого (*Stereum hirsutum*).

Таблица 1. Результаты глубинного культивирования *S. hirsutum* в стеклянных колбах на качалке через 21 день

№ опыта	Пит. среда	Ср.зн. t инкубации °С	Объем среды, мл	Перемешивание об./мин	Масса культ. мицелия г	Объем культ. жид-ти мл
Вариант 1	КСС	27±1	200	70	42,0	150
Вариант 2	КСС	27±1	200	70	44,3	145
Вариант 3	КСС	27±1	200	70	50,0	110
Вариант 4	КСС	27±1	200	70	42,0	150
Вариант 5	КСС	27±1	200	70	28,77	90
Вариант 6	КСС	27±1	200	70	30,33	120
Вариант 7	КСС	27±1	200	70	12,16	125
Ср. зн.	КСС	27±1	200	70	35,65143	127,1429
Ст. ошибка	КСС	27±1	200	70	4,852115	8,581343
Вариант 1	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Вариант 2	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Вариант 3	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Вариант 4	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Вариант 5	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Вариант 6	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Вариант 7	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Ср. зн.	Р-р солода	27±1	200	70	-	-
Ст. ошибка	Р-р солода	27±1	200	70	-	-

В нашем эксперименте в питательной среде с использованием сухого ржаного неферментированного солода во всех семи вариантах на 2-3 сутки изменений с агаровым блоком мицелия не наблюдалось, инокулюм опустился на дно колбы, питательная среда № 1 потемнела, для культивирования *S. hirsutum* данная среда не подходит. В картофельно-сахарозной среде на 2 сутки после засева инокулюм начинал опускаться растущим мицелием. При температуре 27±1°C в картофельно-сахарозной среде формировались 1-2 крупных мицелиальных клубочка и вторичные мелкие (таблица 2).

Таблица 2. Характер роста глубинной культуры *S. hirsutum* с использованием картофельно-сахарозной среды

№ опыта	Количество клубочков мицелия <i>S. hirsutum</i> по классам диаметра (см)			
	0,3-0,5	0,6-2,0	2,1-3,0	3,1-7,5
Вариант 1	0	1	0	1

Вариант 2	0	3	0	0
Вариант 3	0	0	1	1
Вариант 4	0	10	0	2
Вариант 5	0	1	0	1
Вариант 6	6	0	1	2
Вариант 7	50	0	0	1

Поскольку на себестоимость процесса выращивания мицелия грибов большое влияние оказывают оба фактора: состав питательной среды и длительность культивирования, для выращивания гриба *S. hirsutum* мы остановились на картофельно-сахарозной среде и времени культивирования 3 недели, что позволило получать $35,65 \pm 4,85$ г биомассы культурального мицелия и $127,14 \pm 8,58$ мл культуральной жидкости. При поддержании температуры на уровне $27 \pm 1^\circ\text{C}$ наблюдается наиболее интенсивный процесс накопления биомассы, с понижением или с ее повышением интенсивность уменьшается, что не способствует получению конкурентоспособной продукции.

Вывод. Исследования показали, что для оценки влияния компонентов питательных сред на рост и развитие гриба *S. hirsutum* в качестве источников углерода более предпочтительными оказались глюкоза и крахмал. Таким образом, использование при глубинном культивировании картофельно-сахарозной среды, температуры $27 \pm 1^\circ\text{C}$ и перемешивания 70 об./мин является предпочтительным для наилучшего выхода культурального мицелия и культуральной жидкости *S. hirsutum*.

Список литературы

1. Qin H. et al. Cell factories of higher fungi for useful metabolite production // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol, 2016. Vol. 155. P. 199–235.
2. Yun B.S. et al. Sterins A and B new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum* // J. Antibiot, 2002. Vol. 55. P. 208–210.
3. Жук О.Н., Ильючик И.А., Кругавеня А.Д., Никандров В.В. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук, Пінск: ПолесГУ, 2017. № 2. С. 62–68.
4. Жук О.Н., Бокова О.А., Сакович В.В., Никандров В.В. Особенности роста и развития культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) в присутствии ионов марганца (II) // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук, Пінск: ПолесГУ, 2017. № 2. С. 43–50.
5. Калько Е.И., Жук О.Н. Сравнительная характеристика выращивания *Stereum hirsutum* и *Pleurotus ostreatus in vitro* // Биотехнология: достижения и перспективы развития: материалы II международной научно-практической конференции, УО «Полесский государственный университет», г. Пинск, 7-8 декабря 2017 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. Пинск : ПолесГУ, 2017. С 15–16.
6. Калько Е.И. Экология и грибная биотехнология / Ecology and fungal biotechnology // International scientific review of problems and prospects of modern Science and education: XLII International scientific and practical conference : collection of scientific articles, Boston, USA. 25-26 February, 2018. Boston: Massachusetts printed in the United States of America, 2018. Vol. 2 (44). P. 16–22.
7. Калько Е.И. Особенности роста *Stereum hirsutum in vitro* при обогащении среды марганцем / The growth characteristics of *Stereum hirsutum in vitro* enrichment of the medium with manganese // International scientific review of the problems of natural sciences and medicine: I International scientific specialized conference: collection of scientific articles, Boston, USA. 29-30 March, 2018. Boston: Massachusetts printed in the United States of America, 2018. Vol. 3. P. 12–14.
8. Сакович В.В., Жук О.Н. Влияние питательных сред и условий глубинного культивирования на эффективность выращивания вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) // Биотехнология: достижения и перспективы развития: материалы международной научно-практической конференции, УО «Полесский государственный университет». г. Пинск. 7-8 декабря, 2017 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: к.к. Шебеко [и др.], Пинск: ПолесГУ, 2017. С. 39–41.