

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

Калько Е.И. (Республика Беларусь)

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 представителям 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 веществ, грибов *S. hirsutum* на живой организм, его антиоксидантный статус, неспецифическую резистентность, обмен веществ, сохранность и продуктивные качества до сих пор остаются малоизученным. Большой интерес представляет разработка антиоксидантных субстанций на основе грибов рода *Stereum*, включающей мицелий и культуральную жидкость этих грибов.

Выдвигаются определенные требования к составу питательных сред для культивирования грибов рода *Stereum*. В связи с этим 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], культивирование грибов рода *Stereum* в данной лаборатории проводится с 2017 года.

Цель исследования – подбор экономически выгодных питательных сред и условий глубинного культивирования гриба стереум жестковолосистый (*Stereum 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 солод ржаной сухой неферментированный ГОСТ 29272. Приготовление среды № 1: 200 г/л неферментативного молотого солода, разводили с 3л водопроводной воды, настаивали сутки, перемешивали несколько раз в течение настаивания, фильтровали и добавляли воду до 1л, pH 5,0-5,5 [7].

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, до готовности, отвар фильтровали, объем фильтрата доводили до 1 л, добавляли сахарозу (400 г/л картофельного отвара, 30 г/л сахарозы), pH 5,0-6,0 [5].

Среду № 1 и № 2 разливали в стерильные стеклянные колбы объемом 500 мл по 200 мл, в колбах с ватно-марлевыми пробками стерилизовали, в автоклаве 120°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. Край 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 б».

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*. В таблице 1 показаны результаты глубинного культивирования стереума жестковолосистого (*Stereum hirsutum*).

Таблица 1. Результаты глубинного культивирования *S. Hirsutum* в колбах на качалке

№ опыта	Пит. среда	Ср.зн. t инкубации С	Объем среды, мл	Перемешивание об./мин	Масса гриба через 3 недели культивирования	Объем Культ. жидкости
Вариант 1	КСС	27±1°	200	70	42	150
Вариант 2	КСС	27±1°	200	70	44,3	145
Вариант 3	КСС	27±1°	200	70	50	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		
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	-	-

В нашем эксперименте в питательной среде с использованием ржаного неферментированного солода во всех семи вариантах на 2-3 сутки изменений не наблюдалось, инокулюм опустился на дно колбы,

среда потемнела, для культивирования *S. hirsutum* данная среда не подходит. В картофельно-сахарозной среде инокулюм на 2 сутки после засева на стерильную питательную среду кусочки плодового тела начинали опухать растущим мицелием. При температуре $27\pm 1^\circ\text{C}$ на картофельно-сахарозной среде формировались 1-2 крупные мицелиальные клубочки и вторичные мелкие клубочки мицелия [8], 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 г/л биомассы. При поддержании температуры на уровне $27\pm 1^\circ$ наблюдается наиболее интенсивный процесс накопления биомассы. С понижением ее или повышением интенсивность уменьшается, что не способствует получению конкурентоспособной продукции.

Вывод. Для оценки влияния компонентов питательных сред на рост и развитие гриба *S. hirsutum* соответствующие источники углерода или азота в составе исходной полусинтетической питательной среды заменяли другими в эквивалентных количествах. Таким образом, исследования показали, что в качестве источников углерода более предпочтительными оказались глюкоза и крахмал. 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 / References

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. 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.
6. 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.
7. 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.
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.