



УДК 582.28:579.26

**Влияние температуры на скорость роста
и антиоксидантную ёмкость экстрактов мицелия
Hericium coralloides (Fr.) Pers, *Hypsizygus ulmarius* (Bull.)
Redhead и *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer**

Т. Г. Горностай¹, М. С. Полякова¹, Д. Н. Оленников²,
Т. А. Пензина¹, Г. Б. Боровский¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

E-mail: T.G.Gornostay@yandex.ru

Аннотация. Изучено влияние температурного фактора на скорость роста некоторых базидиальных грибов Прибайкалья: *Hericium coralloides* (Fr.) Pers, *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead и *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer. Установлена оптимальная температура роста данных грибов: 20 °С. Определён общий антиоксидантный потенциал (ОАП) экстрактов мицелия базидиальных грибов, культивированных при разных температурах (15, 20, 30 °С). Содержание стандартного антиоксиданта рассчитывали на грамм экстрактивных веществ с помощью фосфолибденового метода по Р. Preito с соавторами. Максимальный антиоксидантный потенциал *H. coralloides*, *I. rheades* и *H. ulmarius* наблюдается при температуре 15 °С и составляет 195,8; 153,6; 132,9 мг/г соответственно. В ходе работы было установлено, чем ниже температура культивирования, тем выше антиоксидантная активность.

Ключевые слова: базидиальные грибы, поверхностное культивирование, температура, антиоксидантная ёмкость.

Введение

Высшие грибы хорошо известны своими медицинскими свойствами, проявляющимися благодаря биологически активным веществам, которые они содержат. В последние десятилетия было показано, что некоторые трютовые грибы обладают протеолитической, иммуномодулирующей, антиоксидантной и антибиотической активностью [1; 22; 23]. Такие грибы, как *Inonotus obliquus* [15; 18], *Laetiporus sulphureus* [4; 8], *Ganoderma lucidum* [11; 12; 16] уже зарекомендовали себя как источник веществ с высокой антиоксидантной активностью. Известно, что антиоксидантная защита у грибов обусловлена действием нескольких источников различной природы: ферментов, пигментов, фенольных соединений и др. [6; 7].

Значительный интерес представляют исследования подобных свойств других малоизученных грибов, а также определение оптимальных условий для их выращивания и накопления ими биологически активных веществ.

В качестве объектов настоящего исследования нами были выбраны штаммы однолетних дереворазрушающих грибов из Прибайкалья, преимущественно встречающихся на лиственных породах деревьев и относящиеся к грибам белой гнили. Представляет интерес сравнение антиоксидантных свойств экстрактов из мицелия нескольких экологически сходных видов, имеющих разную окраску: *Hericium coralloides* (Fr.) Pers, *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead и *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer. О биологических свойствах экстрактов из этих грибов известно очень немного. А. В. Автономовой и М. И. Леонтьевой было показано наличие противоопухолевой активности водных экстрактов мицелия *H. ulmarius* на модели Т-клеточной лимфомы Р, при этом торможение скорости роста опухоли достигало 80 % [1]. Ранее было установлено, что антиоксидантная активность экстрактов этого гриба сопоставима по величине с известными и широко применяемыми веществами [1; 13]. На данный момент в научной литературе отсутствует информация об исследованиях антиоксидантной активности экстрактов из *I. rheades* и *H. coralloides*, другие свойства экстрактов из этих грибов также слабо изучены. Высокая антиоксидантная активность экстрактов из родственного и уже хорошо изученного вида *I. obliquus* определила наш интерес к *I. rheades*.

Исследуя процессы накопления веществ, имеющих антиоксидантную активность, наиболее важно оценить два параметра – накопление биомассы, связанное со скоростью линейного роста колонии, и содержание веществ с антиоксидантной активностью в мицелии. На оба параметра оказывают влияние, иногда разнонаправленное, выбранные условия культивирования, в частности, температура.

Целью данной работы было определение температурной зависимости скорости роста мицелия вышеперечисленных видов трутовых грибов и общей антиоксидантной ёмкости спиртовых экстрактов из их мицелия, выращенного при разной температуре культивирования.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы базидиальных макромицетов *H. coralloides*, *H. ulmarius* и *I. rheades*, собранные в Прибайкалье и введённые в культуру в июле-августе 2012 г. Культуры хранили при температуре 4 °С на обеднённой среде, содержащей дрожжевой экстракт. Пересев в свежеприготовленную среду осуществляли раз в год. Линейную скорость роста измеряли радиально, выращивая мицелий на чашках Петри на стандартной среде с суслон при разных температурах (15, 20, 25 °С). Показатели роста снимали каждые 3 дня. Ростовой коэффициент рассчитывали по формуле [2]:

$$PK = d \times h \times g / t, \quad (1)$$

где d – диаметр колонии, мм; h – высота колонии; мм, g – плотность колонии; t – возраст колонии, сут.

Мицелиальную массу для определения общего антиоксидантного потенциала (ОАП) получали путём выращивания на твёрдой стандартной среде с суслон в течение 7 дней, далее мицелий пересаживали на жидкую стандартную среду с суслон в колбы объёмом 250 мл, содержащие 120 мл среды. Выращивание проводили в темноте. Контролируемые температурные условия (15, 20, 30 °С) для выращивания мицелия создавали с использованием термостатированных камер Binder станции искусственного климата (фитотрона) СИФИБР СО РАН. Отделение мицелиальной массы от культуральной жидкости проводили с помощью вакуумной фильтрации, мицелий для очистки промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянной массы при температуре 35 °С.

Высушенный мицелий грибов, выращенный при разных температурах, измельчали до порошка, 50 мг экстрагировали 1 мл 70%-ного этанола в течение 20 мин на ультразвуковой ванне при температуре 40 °С. Экстракт центрифугировали 20 мин при 3000 г на MiniSpin («Eppendorf», Германия). Для исследования использовали прозрачный верхний слой.

Анализ ОАП спиртовых экстрактов из мицелия оценивали фосфомолибденовым методом в соответствии с методикой Р. Preito с соавторами [20]. Метод основан на восстановлении Mo (VI) в Mo (V) исследуемым экстрактом с последующим формированием зелёного фосфомолибденового комплекса в кислой среде. В качестве стандартного антиоксиданта использовали протокатеховую кислоту. Содержание стандартного антиоксиданта на грамм экстрактивных веществ рассчитывали по формуле:

$$\text{ОАП (\%)} = (A \times K_v / m)_{\text{сырья}} \times (m / A \times K_v)_{\text{стандарт}} \times 100 \%, \quad (2)$$

где A – оптическая плотность, K_v – коэффициент разбавления, m – масса (вес навески каждого образца).

$$\text{ОАП (мг/г)} = \text{АОЕ (\%)} \times 10. \quad (3)$$

Все эксперименты проведены в трёх биологических повторностях. Обработку данных проводили с использованием программы Excel из пакета MS Office 2010. На диаграмме и графике представлены среднее значение и ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Учитывая показатели среднесуточной температуры в Прибайкалье в июле-августе, для анализа влияния температурного фактора на скорость роста мицелия был выбран ряд значений температуры, предположительно подходящих для его активного роста (15, 20, 25 °С) (рис. 1). В ходе исследования характеристик роста штаммов обнаружено, что исследуемые виды активно растут при выбранных температурах. Максимальную скорость роста для всех трёх видов грибов наблюдали при температуре 20 °С. Радиус колоний *H. coralloides*, *H. ulmarius* и *I. rheades* на 16-е сут. оставлял 26, 38 и

32 мм, а ростовой коэффициент: 97,5; 95 и 120 соответственно. Согласно классификации А. С. Бухало [2] при температуре культивирования 20 °С данные грибы можно отнести к быстрорастущим и растущим со средней скоростью, поскольку их ростовой коэффициент находится в пределах 100 и более. Этот показатель является важным для оценки возможности использования грибов в биотехнологии.

Для изучения влияния температурного фактора на показатели ОАП был выбран более широкий диапазон температур (15, 20, 30 °С), чем тот, что выдерживался при постоянном культивировании, с целью охарактеризовать ОАП экстрактов из мицелия, выращенного также и при температурах выше оптимума. Было установлено, что для изученных нами штаммов грибов из Прибайкалья высокие показатели антиоксидантного потенциала характерны при всех применявшихся значениях температур. Однако, как видно из рис. 2, максимальный АОП экстрактов из мицелия проявляется при температуре культивирования 15 °С. Наибольшим потенциалом обладает экстракт из *H. coralloides* (195,8 мг/г).

С ростом температуры культивирования у всех трёх видов происходило постепенное снижение ОАП. Наиболее значимое изменение прослеживается для *H. coralloides*: 195,8 мг/г при 15 °С, 122,5 мг/г при 20 °С, 85,1 мг/г при 30 °С и *I. rhodes*: 153,6 мг/г при 15 °С, 96 мг/г при 20 °С, 73 мг/г при 30 °С. Снижение ОАП у экстрактов из *H. ulmarius* оказалось не столь значительным: 132,9 мг/г при 15 °С, 122,7 мг/г при 20 °С, 92,4 мг/г при 30 °С.

Полученные результаты согласуются с современными представлениями о стратегии антиоксидантной защиты грибов и подтверждают выявленные ранее закономерности о влиянии условий на синтез метаболитов [7].

Известно, что при температуре ниже оптимума в клетках происходит угнетение цитохромного пути дыхания в митохондриях, дисбаланс генерации потенциала и его утилизации, что приводит к повышенной продукции активных форм кислорода (АФК) и развитию окислительного стресса [19]. Например, при низкой температуре роста в клетках мицелия грибов *Penicillium olsonii* и *P. waksmanii* активируются различные системы защиты от окислительного стресса и происходит накопление метаболитов, обладающих антиоксидантной активностью [21], такая защитная реакция наблюдается и у других организмов, например растений [3; 5]. Можно предположить, что именно с этим связаны высокие показатели АОП экстрактов из мицелия, выращенного при низкой температуре. При высокой температуре в некоторых организмах также отмечено развитие окислительного стресса и индукции систем антиоксидантной защиты [14; 17]. Мы не обнаружили увеличения АОЕ спиртовых экстрактов из мицелия, выращенного при температуре выше оптимальной (рис. 2), напротив, она продолжала снижаться. Возможно, в отличие от ситуации при низкой температуре, стратегия адаптации к гипертермии у исследованных нами грибов не предусматривает значительного накопления спирторастворимых соединений.

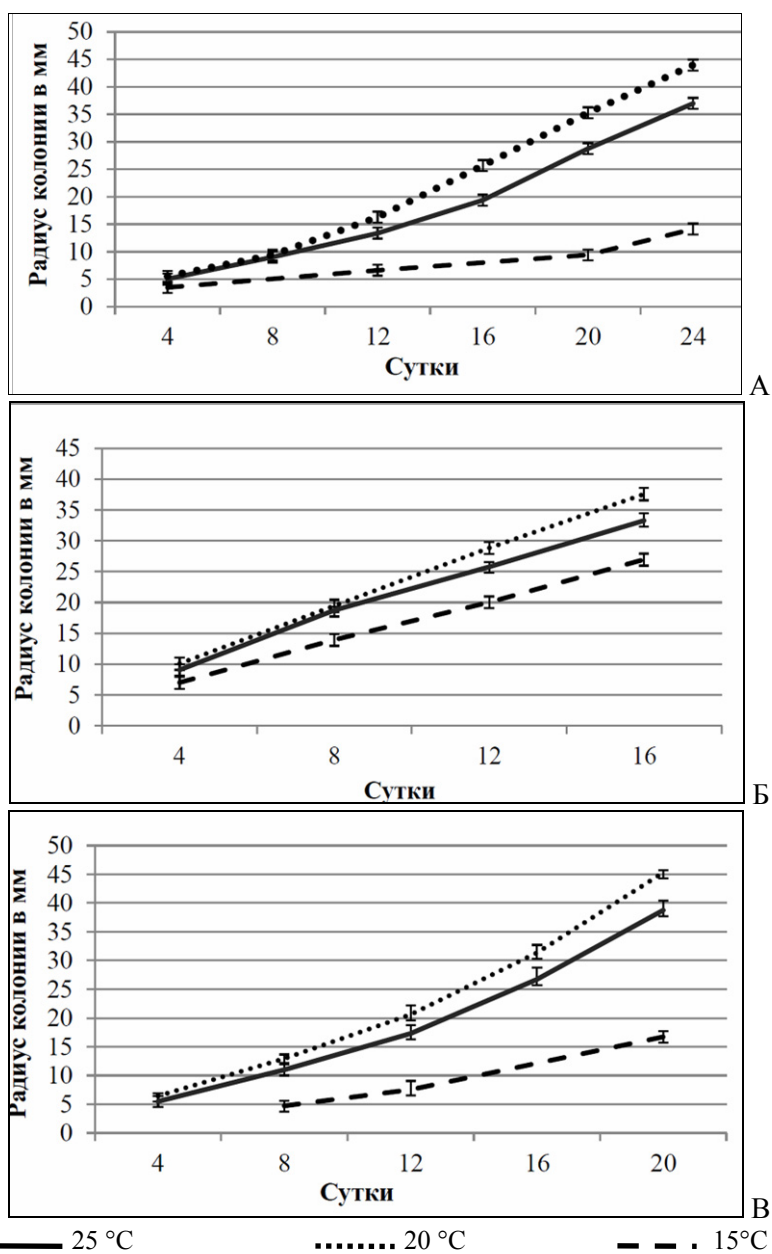


Рис. 1. Характеристики роста разных видов дереворазрушающих грибов при различных температурах культивирования: А – *Hericium coralloides*; Б – *Hypsizygus ulmarius*; В – *Inonotus rheades*

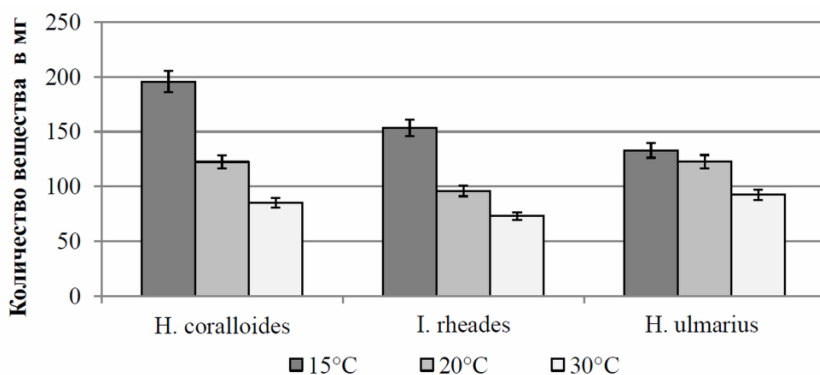


Рис. 2. Влияние температурного фактора на общую антиоксидантную ёмкость спиртовых экстрактов грибного мицелия

При сравнении показателей АОП этанольных экстрактов из плодовых тел *L. sulphureus* (105,41–354,73 мг/г) [8], АОП пигментных фракций *I. obliquus* (150,51–569,40 мг/г) [9], а также суммарного содержания антиоксидантов зелёного (84,4–172,2 мг/г) и чёрного (29–109 мг/г) чая [10], можно видеть, что АОП спиртовых экстрактов из мицелия исследованных нами видов базидиальных грибов *H. coralloides* (195,8–85,1 мг/г), *I. rheades* (153,6–73 мг/г) и *I. ulmarius* (132,9–92,4 мг/г) при некоторых температурах культивирования не уступает по данному показателю широко известным источникам природных антиоксидантов.

Результаты эксперимента показали, что яркая пигментация объекта не соответствует максимальному значению АОП. Таким образом, интенсивность пигментации не может служить критерием отбора при поиске продуцентов с высокой антиоксидантной активностью.

Индукция накопления антиоксидантов при низкотемпературном стрессе создаёт возможность использования гипотермии для увеличения их содержания в биомассе. В ходе дальнейших исследований мы предполагаем установить химическую природу веществ, проявляющих антиоксидантную активность в экстрактах из мицелия исследованных грибов.

Заключение

Исследованные нами базидиомицеты *H. coralloides*, *H. ulmarius* и *I. rheades* проявили себя перспективными источниками антиоксидантов природного происхождения. Исходя из полученных данных о высокой скорости роста и достаточно высоких показаниях АОП при 20 °С, можно заключить, что именно эта температура оптимальна для выращивания биомассы мицелия грибов в целях использования в биотехнологии. Требуется дальнейшего изучения вопрос о возможности индукции накопления антиоксидантов при низкотемпературном стрессе для увеличения их содержания в биомассе мицелия.

Список литературы

1. Автономова А. В. Противоопухолевые и антиоксидантные свойства полисахаридных экстрактов и фракций биомассы базидиомицета *Hypsizygos ulmarius*, полученных путем глубинного культивирования / А. В. Автономова, М. И. Леонтьева // Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 31–39.
2. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. – Киев : Наук. думка, 1988. – С. 43–44.
3. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя / М. С. Радюк [и др.] // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 2. – С. 193–199.
4. Водорастворимые эндополисахариды плодовых тел *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murr. / Д. Н. Оленников [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 597–605.
5. Вызванные холодом изменения активности ферментов и содержания пролина, углеводов и хлорофиллов у пшеницы / Н. Джавадиан [и др.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 4. – С. 580–588.
6. Гесслер Н. Н. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов. Обзор / Н. Н. Гесслер, А. А. Аверьянов, Т. А. Белозерская // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1342–1364.
7. Гесслер Н. Н. Активные формы кислорода и стратегии антиоксидантной защиты у грибов (Обзор) / Н. Н. Гесслер, Т. А. Белозерская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 565–575.
8. Оленников Д. Н. Антиоксидантные компоненты плодовых тел *Laetiporus sulphureus* / Д. Н. Оленников, Л. М. Танхаева, С. В. Агафонова // Прикл. биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 4. – С. 462–468.
9. Оленников Д. Н. Структурно-функциональное исследование биополимеров растительного и грибного происхождения и совершенствование методов их анализа : дис. ... д-ра фарм. наук / Д. Н. Оленников. – Улан-Удэ, 2012. – 299 с.
10. Федина П. А. Определение антиоксидантов в продуктах растительного происхождения амперометрическим методом / П. А. Федина, А. Я. Яшин, Н. И. Черноусова // Химия растит. сырья. – 2010. – № 2. – С. 91–97.
11. Antioxidant activity of ethanol extract from *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium supplemented with herbs / H. Zhen [et al.] // Academia Journal of Medicinal Plants. – 2013. – Vol. 1. – P. 6–13.
12. Antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* crude exopolysaccharid / Mahendran S. [et al.] // Indian J. of Innovations and Developments. – 2012. – Vol. 1. – P. 1–6.
13. Badu D. R. Antioxidant properties and electrochemical behavior of cultivated commercial Indian edible mushrooms / D. R. Badu, G. N. Rao // Food Scientists and Technologists. – 2013. – Vol. 50 – P. 301–308.
14. Chary. P. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development / P. Chary, D. O. Natvig // J. of bacteriology. – 1989. – Vol. 171. – P. 2646–2652.
15. Cui Y. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* / Y. Cui, D. S. Kim, K. C Park // J. of Ethnopharmacology. – 2005. – Vol. 96. – P. 79–85.
16. Girjal V. U. Antioxidant properties of the peptides isolated from *Ganoderma lucidum* fruiting body/ V. U. Girjal, S. Neelagund, M. Krishnappa // International J. of Peptide Research and Therapeutics. – 2012. – Vol. 18. – P. 318–325.

17. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* / R. I. Abrashev // Can. J. Microbiol. – 2008. – Vol. 26, N 54. – P. 977–983.
18. Lishuai M. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharid from mushroom *Inonotus obliquus* / M. Lishuai, C. Haixia // Carbohydrate Polymers. – 2012. – Vol. 89. – P. 371–378.
19. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat / N. Mizuno [et al.] // J. of Plant Physiology. – 2008. – Vol. 165. – P. 462–467.
20. Preito P. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E / P. Preito, M. Pineda, M. Aguilar // Analytical Biochemistry. – 1999. – Vol. 269. – P. 337–341.
21. Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctica / Y. G. Gocheva [et al.] // Extremophiles. – 2009. – Vol. 18. – P. 273–281.
22. Wasser S. P. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S. P. Wasser, A. L. Weis // Critical Review Immunology. – 1999. – Vol. 19. – P. 65–96.
23. Zjawiony J. K. Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi / J. K. Zjawiony // J. of Natural Products. – 2004. – Vol. 67. – P. 300–310.

The Temperature Effects on the Growth Rates and the Antioxidant Capacities of the Mycelium *Hericium coralloides* (Fr.) Pers, *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead and *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer

T. G. Gornostay¹, M. S. Polyakova¹, D. N. Olennikov²,
T. A. Penzina¹, G. B. Borovskii¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

²Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

Abstract. The influence of temperature on growth rate of some basidiomycetes from Baikal region: *Hericium coralloides* (Fr.) Pers, *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead and *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer was examined. The optimum temperature for growth of fungi 20 °C. Total antioxidant capacity (TAC) of extracts from basidiomycetes mycelia cultured at different temperatures (15, 20, 30 °C) has been defined. The content of the standard antioxidant calculated per gram of extractives by phosphomolybdenic method for P. Preito et al. The maximum antioxidant potential *H. coralloides*, *I. rheades* and *H. ulmarius* is observed at 15 °C and is 195,8; 153,6; 132,9 mg/g, respectively. During operation it was established, the lower cultivation temperature gives the higher antioxidant activity.

Key words: basidiomycetes, surface cultivation, temperature, antioxidant capacity.

Горноста́й Татьяна Геннадьевна
аспирант, ведущий инженер
Сибирский институт физиологии

Gornostay Tatyana Gennadyevna
Postgraduate, Leading Engineer
Siberian Institute of Plant Physiology

и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59
e-mail: T.G.Gornostay@yandex.ru

and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-46-59
e-mail: T.G.Gornostay @ yandex.ru

Полякова Марина Станиславовна
ведущий инженер
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-58-78
e-mail: poljakova.m@gmail.com

Polyakova Marina Stanislavovna
Leading Engineer
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-58-78
e-mail: poljakova.m @ gmail.com

Оленников Даниил Николаевич
доктор фармакологических наук,
старший научный сотрудник
Институт обшей и экспериментальной
биологии СО РАН
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
тел.: (3012) 43-34-63
e-mail: oldaniil@rambler.ru

Olennikov Daniil Nikolaevich
Doctor of Sciences (Pharmacology),
Senior Research Scientist
Institute of General and Experimental
Biology SB RAS
6, Sakhyanova st., Ulan-Ude, 670047
tel.: (3012) 43-34-63
e-mail: oldaniil@rambler.ru

Пензина Татьяна Александровна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-58-78
e-mail: penzina@sifibr.irk.ru

Penzina Tatiana Aleksandrovna
Candidate of Sciences (Biology), Senior
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-58-78
e-mail: penzina@sifibr.irk.ru

Боровский Геннадий Борисович
доктор биологических наук, главный
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
тел.: (3952) 42-46-59
факс: (3952) 51-07-54
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru.

Borovskii Gennadii Borisovich
Doctor of Sciences (Biology)
Chief Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-46-59
fax: (3952) 51-07-54
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru.