

На правах рукописи



ИВАНОВА Ирина Евгеньевна

**ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.) MURRILL,
КСИЛОТРОФОВ ДРЕВОСТОЕВ ХВОЙНЫХ, И ОЦЕНКА
ПЕРСПЕКТИВ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва 2013

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств» на кафедре «Химия пищи и пищевая биотехнология»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Громовых Татьяна Ильинична

Официальные оппоненты: Шнырева Алла Викторовна
доктор биологических наук, профессор
Кафедра микологии и альгологии биологического факультета
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Бирюков Валентин Васильевич
доктор технических наук, профессор
Заведующий кафедры экологической и промышленной биотехнологии
Университет машиностроения (МАМИ)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Мордовский государственный
университет им. Н.П. Огарёва»

Защита диссертации состоится 09 апреля 2013 г. В 15.30 на заседании
диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном
университете им. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1,
стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М-1.

Тел. 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан ___ марта 2013 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета



к.б.н. Пискункова Нина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в России наблюдается повышенное внимание к базидиальным грибам, которые имеют большое значение в биотехнологии пищевых продуктов и фармацевтических производств. Объектами большинства таких разработок являются базидиомицеты, широко исследуемые в различных странах мира из родов *Grifola*, *Coprinus*, *Ganoderma*, *Lentinula*, *Laetiporus*, *Panus*, *Pleurotus*, *Trametes*. Возможность использования рассматриваемых грибов для создания профилактических и лечебных средств стала реальной после многолетних фундаментальных исследований процессов жизнедеятельности макромицетов, в том числе особенностей их роста и развития, характера и механизма метаболической и ферментативной активности (Белова Н.В., 2001, Гвоздкова Т.С., 2007). В последние десятилетия привлекают внимание в качестве ведущих объектов биотехнологии, полезных продуктов и препаратов грибы рода *Laetiporus*.

Широко известен вид *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, поражающий листовые породы древостоев. Он обладает хорошими вкусовыми, питательными и лекарственными свойствами. Кроме того, следует отметить и способность этого вида гриба к синтезу полиеновых пигментов каротиноидной природы (ксантофиллы). В последние десятилетия лекарственные препараты, содержащие каротиноиды, используют для профилактической антираковой терапии (Прокопенко Н.Г., 2000; Феофилова Е.П. 2001, 2006; Woodall А.А., 1997).

Существует информация об антимикробных, антивирусных свойствах соединений, как плодовых тел, так и мицелия *Laetiporus sulphureus* (Ефременкова О.В., 2006; Квачева З.Б., 2005). Растущая популярность вида *Laetiporus sulphureus* делает актуальной разработку вариантов технологии его выращивания с использованием сырьевой базы и отходов растениеводства.

Несмотря на то, что общий объем публикаций, посвященный базидиомицете *Laetiporus sulphureus* чрезвычайно велик, отсутствуют сведения о биохимическом составе и бактерицидных свойствах плодовых тел и мицелия штаммов рода *Laetiporus*, развивающихся на хвойных породах деревьев. В настоящее время таких представителей рода *Laetiporus*, обнаруженных в Северной Америке, стали относить к виду *Laetiporus conifericola* (Burd and Vanik, 2001). На территории России сведения о штаммах, выделенных с древостоев хвойных, отсутствуют. В связи с этим, поиск штаммов рода *Laetiporus*, выделенных из плодовых тел пораженных древостоев хвойных, и исследование их видовой принадлежности открывает перспективы пополнения коллекций и дает возможность использования в биотехнологии.

Цель работы – изучение штаммов-ксилотрофов рода *Laetiporus*, выделенных с древостоев хвойных, и оценка возможности их использования в биотехнологии.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- изучить морфолого-культуральные, генетические и физиологические особенности и идентифицировать видовую принадлежность штаммов *Laetiporus sp*;

- изучить химический состав биомассы мицелия *Laetiporus sulphureus* (содержание белка и его переваримость, количество аминокислот, липидов, жирных кислот, каротиноидов, углеводов);

- изучить влияние физических факторов на показатели роста штаммов *Laetiporus sulphureus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования;

- оптимизировать состав технологической среды для получения биомассы мицелия и биосинтеза каротиноидов;

- изучить антиоксидантную, антимикробную, противоопухолевую активность и токсичность штаммов *Laetiporus sulphureus*;

- изучить влияние соли селена на рост штаммов *Laetiporus sulphureus* и разработать способ получения селенсодержащего мицелия;

- изучить влияние штаммов *Laetiporus sulphureus* на пробиотическую культуру *Lactobacillus acidophilus*;

- отобрать наиболее перспективные штаммы в качестве продуцентов биологически активных веществ.

Научная новизна работы

Впервые выделены штаммы с хвойных древостоев *Larix sibirica* L. рода *Laetiporus* на территории России. На основании исследований культуральных, физиологических свойств и молекулярно-генетической идентификации штаммов рода *Laetiporus* установлена их принадлежность к виду *Laetiporus sulphureus*.

Мицелий штаммов-ксилотрофов хвойных *Laetiporus sulphureus* может быть использован для получения белка, незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот и каротиноидоподобных соединений. Максимальное накопление каротиноидов установлено у штамма *Laetiporus sulphureus* MZ-22.

На культурах клеток простейших доказана безопасность мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus*.

Показана, переваримость белка биомассы мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus*.

Установлено, что в условиях максимального выхода биомассы отмечен более низкий уровень накопления каротиноидов для всех исследуемых штаммов.

Установлено влияние соли селена на показатели роста мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus*; определена оптимальная концентрация селена в среде для получения селенсодержащего мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus*.

Выявлена антимикробная активность спиртовых экстрактов мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* в отношении условно-патогенных бактерий и цитотоксичность в отношении линии опухолевых клеток Сасо-2.

Показано отсутствие ингибирующего влияния препарата мицелия штамма *Laetiporus sulphureus* на ростовые показатели пробиотической культуры *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44 (ВКПМ В-9647) и обоснована целесообразность

применения препарата мицелия штамма для повышения антиоксидантной активности молочных продуктов.

Практическая значимость работы

- Отобраны штаммы-продуценты каротиноидов и белка, которые депонированы в коллекциях: *L. sulphureus* Ls 1- 06 (ВКПМ F-982) и *L. sulphureus* (ВКМ F-4276D).

- разработана оптимальная технологическая среда и условия для жидкофазного погруженного культивирования мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus*;

- показана возможность использования растительных отходов предприятий АПК для биоконверсии штаммом *L. sulphureus* Ls C-Q;

- в результате исследований противоопухолевой активности экстрактов мицелия на линии опухолевых клеток даны рекомендации для использования штамма *Laetiporus sulphureus* MZ-22 как продуцента противоопухолевых соединений;

- разработан способ получения селенсодержащего мицелия на основе штамма *Laetiporus sulphureus* MZ-22, обладающего способностью к связыванию селена в биомассе и биосинтезу каротиноидоподобных соединений в количестве 17,8 мг/г.

Апробация работы

Основные положения работы и результаты исследований представлены на конкурсах и конференциях: Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Экологические безопасные ресурсосберегающие технологии и средства переработки сельскохозяйственного сырья и производства продуктов питания» (Москва, 2009); 10-ой юбилейной Всероссийской выставке научно-технического творчества молодежи НТТМ (Москва, 2010); V фестивале науки (Москва, 2010); конкурсе молодых ученых VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011); V Международной научно-технической конференции, посвященной 80-летию университета «Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2011); симпозиуме в МГУ им. М.В. Ломоносова «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2011); III Съезде микологов России (Москва, 2012); X Международной научно-практической конференции с международным участием «Живые системы и биологическая безопасность населения» (Москва, 2012).

Работа выполнялась при финансовой поддержке грантов: аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы)», проектов № 4209 и № 9353 «Коллекция культур бактерий, бактериофагов, дрожжевых и мицелиальных грибов как база для научно-образовательного процесса, сохранения биоразнообразия и развития современной биотехнологии»; по госконтракту П175 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг; гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ; тема № 16.120.11.3245.-НШ «Разработка новых пищевых

технологий с участием живых систем на основе нетрадиционных подходов к управлению их жизнедеятельностью и обеспечению качественных показателей готовой продукции».

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 9 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Общий объем диссертации 186 страниц (основной текст – 167 стр.; приложения 19 стр.). Диссертация включает 43 рисунка и 28 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 166 источников, из которых 69 на иностранных языках.

Публикации

Материалы диссертации изложены в 15 публикациях (из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 1 патенте).

Благодарности

Автор выражает благодарность заведующему кафедрой «Химия пищи и пищевая биотехнология» академику РАН, д.т.н. А.И. Жаринову, зав. каф. «Технология молока и молочных продуктов» проф., д.т.н. В.И. Ганиной, доц. каф. «Биохимия» Е.Г. Черемных за помощь, оказанную при работе над диссертацией; руководителю лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха д.б.н. О.В. Королевой за предоставление базы лаборатории для проведения экспериментальных исследований; к.б.н. И.В. Николаеву, аспиранту А.А. Торковой за помощь в проведении исследований.

Отдельная благодарность научному руководителю проф., д.б.н. Т.И. Громоных за неоценимую помощь, понимание и поддержку на всех этапах работы над диссертацией.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи исследований, показана научная новизна и практическая значимость результатов работы

В первой главе представлены сведения о характеристике рода *Laetiporus*, его систематическом положении, приведено описание вида *Laetiporus sulphureus*: его составе, свойствах, морфолого-культуральных особенностях. Показаны аспекты использования плодовых тел и мицелия *Laetiporus sulphureus* для получения биологически активных соединений. Приводятся сведения о современных источниках каротиноидов и биологически активных добавках на их основе. Проанализированы сведения по использованию макромицетов для получения селенсодержащего мицелия.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При выполнении работы объектами исследований служили 12 штаммов, выделенные из плодовых тел пораженных древостоев лиственницы сибирской

Larix sibirica L. в период 1996-2006 гг. в республике Тыва. После проведения скрининга по скорости роста и пигментообразованию были отобраны три штамма: Ls-06 (ВКПМ F-982), MZ-22 (ВКМ F-4276D), Ls C-Q коллекции культур Московского государственного университета пищевых производств.

Культурально-морфологические признаки исследуемых штаммов изучали на различных агаризованных питательных средах (сабуро, крахмало-аммиачная, сусловая, капустная (с добавлением соевой муки, листовенничных опилок и молочной сыворотки) и дрожжевая). Учет результатов проводили в течение всего срока наблюдения по следующим показателям: диаметр разрастания колоний, текстура и форма колоний, пигментация мицелия, плотность и высота воздушного мицелия, среднесуточная скорость роста, ростовой коэффициент. Отбор продуктивных штаммов проводили по показателям ростового коэффициента на исследуемых питательных средах.

Изучение микроморфологических признаков штаммов проводили в камерах Ван-Тигема с использованием световой микроскопии при помощи светового микроскопа марки LW Scientific (США). Микроморфологию ядер изучали с использованием люминисцентной микроскопии, для чего 7, 14 и 21-суточный мицелий фиксировали на покровном стекле в модифицированном растворе Карнуа с последующим окрашиванием реактивом ДАПИ (4',6'-диамидино-2-фенилиндол, SIGMA) в концентрации 500 нг/мл (Ota et al., 1998); в работе использовали микроскоп Axioskop 40 FL, фильтр 02 (Zeiss). Для изучения микроморфологии бластоконидий использовали сканирующую электронную микроскопию. Агаровые блоки с выросшим 7, 14 и 21-суточным мицелием фиксировали в парах осмия. После высушивания образцы закрепляли, напыляли смесь платины и палладия (IB-3 Ion Coater) и просматривали с помощью сканирующего электронного микроскопа «Hitachi» S-405A лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Для подтверждения видовой принадлежности проводили генетическую идентификацию. Исследовали участок ядерной рДНК, содержащий транскрибируемый спейсерный участок ITS. Для анализа хроматограмм, полученных после секвенирования, использовали программу Chromas Pro Sequence Scanner; для поиска гомологичных последовательностей в Генбанке – программу BLAST (www.ncbi.nih.gov). Исследования проводили на базе кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Рост мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* изучали при различных значениях температуры (16, 20, 24, 28 и 32 °С), показателях рН (от 3,5 до 7,5) и при условиях освещенности (500 люкс, фотопериод 12:12) и определяли оптимальные параметры для каждого штамма.

Изучение динамики накопления биомассы штаммами *Laetiporus sulphureus* проводили путем статического жидкофазного культивирования на капустной среде при 28±1 °С. Продуктивность биомассы оценивали весовым методом на 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35 сутки культивирования.

Изучение химического состава мицелия *Laetiporus sulphureus* проводили классическими методами. Содержания белка в мицелии штаммов *Laetiporus sulphureus* определяли по методу Кьельдаля (ГОСТ 26889—86, 1986);

качественный состав аминокислот - на аминокислотном анализаторе Хитачи (Япония); отдельно содержание триптофана - спектрофотометрическим методом (Fletrous D.J., 1993); общее содержание липидов - по методу Блайя и Дайера, предварительно перетерев сырой мицелий с песком в жидком азоте (Бриттон Г., 1986); определение жирнокислотного состава - с помощью газожидкостной хроматографии (ГОСТ Р 51483-99, 2001); количество простых и легкогидролизуемых углеводов - методом Бертрана (ГОСТ 26176-91, 1999), трудногидролизуемых углеводов - методом Кюршнера и Ганака (Ермаков А.И., 1972). Анализ содержания каротиноидов в мицелии штаммов *Laetiporus sulphureus* проводили методом экстракции (Капич А.Н., 1996). Содержание каротиноидов определяли в пересчете β -каротин в экстракте спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian Inc., США). Исследования проводили на базе Института биохимии им. А.Н. Баха.

Культивирование штаммов проводили в течение 20 сут погруженным способом в круглодонных конических стеклянных колбах объемом 750 см³ на качалках при скорости вращения 150 об/мин и температуре 28±1 °С. Штаммы *Laetiporus sulphureus* культивировали на модифицированной питательной глюкозо-пептонной среде (Hwang H. S., 2008), в которой пептон заменяли на молочную сыворотку: глюкоза - 10 г/л, молочная сыворотка - 21 г/л, КН₂РО₄ - 0,6 г/л, К₂НРО₄ - 0,4 г/л, ZnSO₄×7H₂O - 1 мг/л, FeSO₄×7H₂O - 0,5 мг/л, MnSO₄×5H₂O - 50 мг/л, MgSO₄×7H₂O - 0,48 г/л, CaCl₂ - 0,5 г/л. Для подбора оптимального состава питательной среды использовали метод полного факторного эксперимента (N = 2×10³). Подбор оптимального состава среды проводили по изменению концентраций (факторы варьирования) г/л: MnSO₄×5H₂O (верхний уровень - 0,15, нижний - 0,05), глюкоза (верхний уровень - 15, нижний - 5), молочная сыворотка (верхний уровень - 27, нижний - 15).

Твердофазное культивирование проводили на растительных субстратах: подсолнечной лузге, листовенничных опилках и смеси злаковых культур: пшеница, просо, овес. Оценивали рост изучаемых штаммов по показателям среднесуточной скорости роста и характеру формирования воздушного мицелия.

Антимикробную активность культуральных жидкостей штаммов, содержащих продукты метаболизма, и спиртовых экстрактов из мицелия базидиомицетов изучали методом дисков (Егоров Н.С., 1994). В качестве тест-культур использовали штаммы грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных микроорганизмов коллекции Аналитического испытательного центра «БИОТЕСТ» МГУПБ: *Staphylococcus aureus* 6538-P, *Escherichia coli* M17, *Salmonella typhimurium* 79, *Listeria monocytogenes* 766.

Противоопухолевую активность экстрактов мицелия штаммов проверяли на линии опухолевых клеток Сасо-2 по показателю жизнеспособности клеток, оценивая цитотоксичность действия мицелия.

Антиоксидантную емкость экстрактов мицелия штаммов определяли по методу пероксильного радикала (Prior R.L., 2003).

Изучение токсичности штамма *Laetiporus sulphureus* проводили путем биотестирования с использованием простейших – инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrachymena pyriformis* коллекции простейших МГУПБ (Черемных Е.Г., 2004). Влияние препарата мицелия штамма *Laetiporus sulphureus* на пробиотическую культуру *Lactobacillus acidophilus*– АСТ-44 (ВКПМ В-9647) изучали путем культивирования закваски методом НВЧ (Меркулова Н.Г., 2009).

Действие соли селенита натрия на рост штаммов *Laetiporus sulphureus* оценивали культивированием на агаризованных и жидких питательных средах. Получение селенсодержащего мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* проводили путем жидкофазного культивирования на капустной селенсодержащей среде. Концентрацию селена в высушенном мицелии штаммов измеряли методом атомно-абсорбционной спектрометрии (МУК 4.1.991-00, 2000).

При проведении научно-исследовательской работы получали не менее трех-пяти параллельных вариантов результатов экспериментов. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием пакета программ *Statistica 6.0*.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS*

С начала 21 столетия американскими учеными было показано, что представители рода *Laetiporus*, поражающие древостой хвойных, принадлежат к виду *Laetiporus conifericola* (Burds and Vanik, 2001). В наших исследованиях были использованы 12 штаммов, выделенные из плодовых тел пораженных древостоев *Larix sibirica* L., произрастающих в Республике Тыва. Все исследуемые изоляты на агаризованных средах образуют колонии с ватообразным воздушным высоким мицелием от бледно-кремового до ярко розовато-оранжевого. Цвет обратной стороны колоний бледно-желтого цвета.

Для дальнейшей работы были отобраны 3 штамма, различающиеся способностью к образованию пигмента (воздушный мицелий штамма Ls 1-06 розовато-оранжевого, Ls C-Q бледно-розового оттенка, MZ-22 – ярко-оранжевого цвета) и имеющие наиболее высокие показатели роста.

Изучение микроморфологии мицелия штаммов (рисунок 1) показало, что он состоит из длинных гиф с простым ветвлением, без пружек, отмечалось образование овальных, шарообразных и грушевидных структур, расположенных на гифах терминально или интеркалярно (рисунок 1 А). При изучении микроморфологии базидиоспор в режиме световой микроскопии было установлено, что штаммы принадлежат к роду *Laetiporus*. Мицелий исследуемых изолятов дикариотический, ядра расположены тесно друг к другу (рисунок 1 Г).

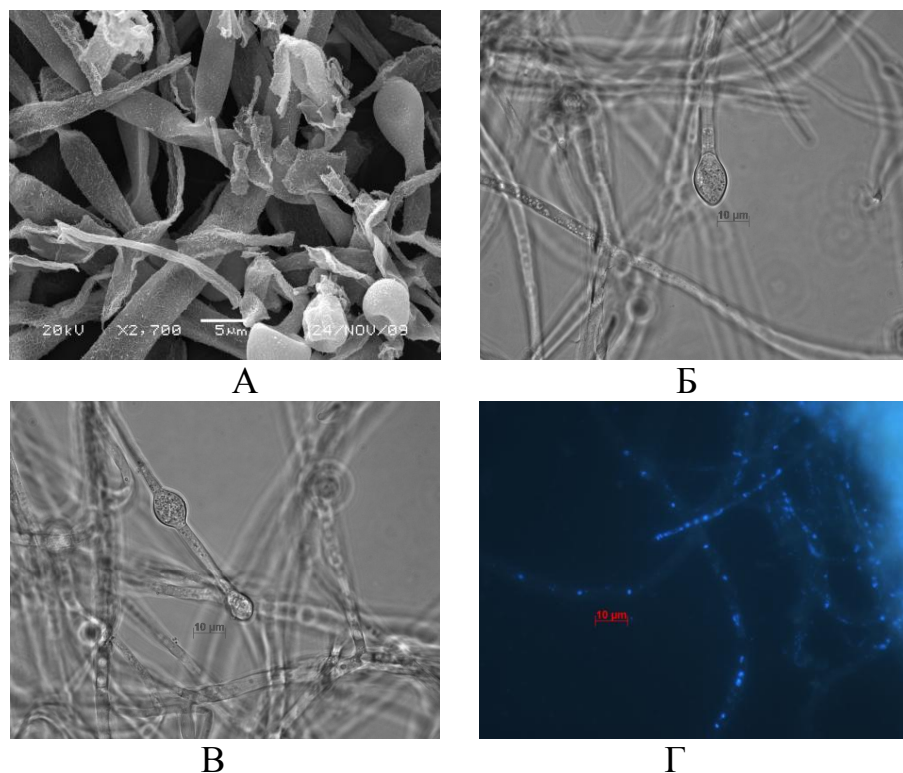


Рисунок 1 – Микроморфология мицелия штаммов *Laetiporus sp*; А – шарообразные структуры на гифах (РЭМ-микроскопия); Б - утолщение клетки мицелия при образовании хламидоспор; В - вздутия в районе септ; Г- дикариотный мицелий

На основании микроморфологических и культуральных признаков штаммов на агаризованных средах установлено их сходство с видом *Laetiporus sulphureus*. Изучение их генетической принадлежности секвенированием переменных участков ITS рДНК подтвердило сходство с видом *Laetiporus sulphureus* на 99 % (в качестве типового вида использован *L. sulphureus* LAE 09-LS03). Таким образом, установлено, что выделенные штаммы из плодовых тел, растущих на хвойных породах деревьев на территории Республики Тыва, принадлежат к виду *Laetiporus sulphureus*, в связи с чем, утверждение авторов Ж. Бурдсала и М. Баника о том, что на древостоях хвойных паразитирует только вид *Laetiporus conifericola* неправомерно, так как полученные нами данные этому противоречат.

Изучение культуральных особенностей штаммов *Laetiporus sulphureus* на агаризованных питательных средах показало, что максимальный прирост мицелия отмечен на капустном агаре на 12 сутки у штамма Ls 1-06; на 10-е сутки у штамма Ls C-Q и на 8-е у штамма MZ-22. Наибольшая скорость роста приходится на 4 - 6 сутки культивирования. Учитывая ростовые коэффициенты, штаммы *Laetiporus sulphureus* MZ-22 и Ls C-Q можно отнести к быстро растущим, а штамм Ls 1-06 – к виду, растущему со средней скоростью. Наиболее оптимальной средой для культивирования штаммов по показателям роста является капустный агар, что подтверждают исследования по среднесуточной скорости роста и динамики прироста колоний.

Для повышения ростовых показателей штаммов *Laetiporus sulphureus* проводили модификацию капустной среды путем добавления различных составляющих: листовенничные опилки, соевая мука «сопролец» и молочная сыворотка. Высокий ростовой коэффициент у всех штаммов наблюдается на среде, содержащей молочную сыворотку (от 182 до 281). Формирующийся мицелий штаммов характеризуется средней плотностью и высотой мицелия. Добавление листовенничных опилок в питательную среду увеличивает скорость роста, однако, из-за рыхлости мицелия ростовые показатели ниже.

Исследования роста всех штаммов показали, что оптимум температуры составляет 24-28 °С. При культивировании изменяется морфология штаммов: при температуре 30-32 °С штаммы формируют более рыхлый мицелий с ярко выраженными концентрическими кругами, тогда как при температуре 16-20 °С – более плотный.

Все исследуемые штаммы *Laetiporus sulphureus* растут при большом интервале рН среды; однако более высокие показатели роста наблюдались при значении рН – 3,5, тогда как самые низкие – при рН 7,5.

Исследования показали, что при культивировании штаммов *Laetiporus sulphureus* в условиях освещенности 500 люкс с фотопериодом 12:12 часов на агаризованных средах достоверных изменений ростовых показателей не отмечено. Однако в мицелии штаммов в с условиях освещенности накапливалось больше пигмента.

ЖИДКОФАЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS*

Динамика накопления биомассы штаммами *Laetiporus sulphureus*

Интенсивность развития *Laetiporus sulphureus* можно оценить по накоплению биомассы мицелия при выращивании штаммов на жидких питательных средах. Исследования показали, что при статическом жидкофазном культивировании на капустной среде наибольшее накопление биомассы (в стационарной фазе роста) отмечается на 30-е сутки культивирования для штамма Ls 1-06 и составляет 3,6 г/л на абсолютно сухую биомассу (АСБ), а для штамма Ls C-Q – 1,9 г/л. Штамм MZ-22 быстрее достигает максимальной величины накопления биомассы – на 20-е сут, которая составляет 2,1 г/л АСБ, чем подтверждается и его высокая скорость роста на агаризованных средах (рисунок 2).

Культивирование штаммов *Laetiporus sulphureus* на среде с дополнительными источниками азота и углерода позволило повысить продуктивность биомассы мицелия, выход которой на среде с молочной сывороткой увеличился до 3,8 г/л для штамма Ls C-Q; 4,86 г/л для штамма Ls 1-06; 5,1 г/л для штамма MZ-22.

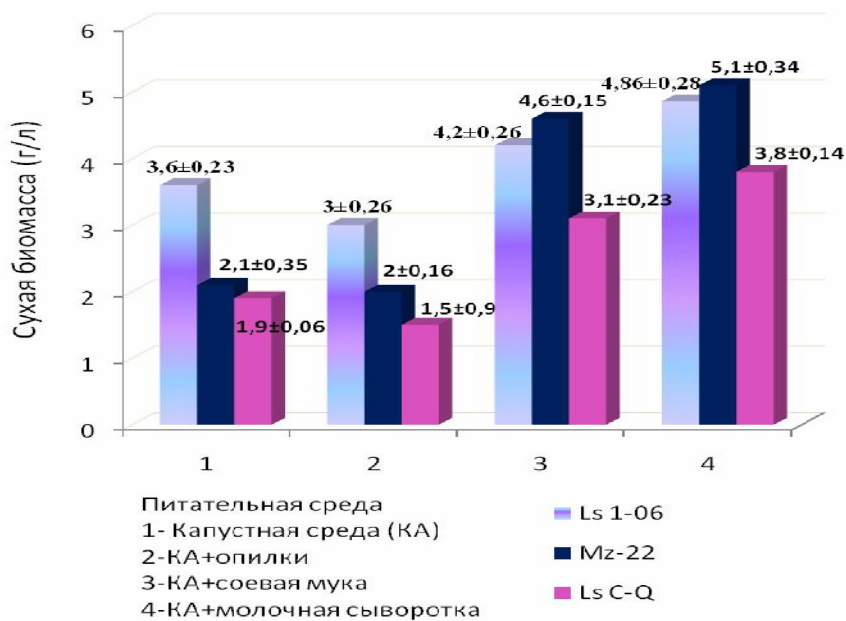


Рисунок 2 - Выход биомассы мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* при статическом жидкофазном культивировании на капустной среде

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИЦЕЛИЯ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS*

Биологическая ценность биомассы базидиомицетов определяется не только количеством белка, липидов, углеводов, но и качественным содержанием аминокислот в белке, жирнокислотным составом липидов. Для представителей *Laetiporus sulphureus* также важно количество каротиноидоподобных соединений, которые синтезируют штаммы этого вида, выделенные из лиственных пород.

Согласно полученным данным, в биомассе мицелия исследуемых штаммов количество белка составляет от 15,03 до 16,8 %, в котором обнаружено большое количество незаменимых аминокислот (более 30 %). Это не превышает показатели для штаммов, указанных авторами Т.С. Гвоздковой, Т.В. Чернооком и другими. Однако следует отметить высокое содержание аминокислоты триптофана (1,66-2,22 г/100 г белка) в изучаемых нами штаммах, что ранее не было установлено выше перечисленными авторами у исследуемых продуцентов. Отмечалось в основном превалирование в биомассе лейцина и валина.

Лимитирующая аминокислота в биомассе мицелия – метионин, скор которой составляет 30,3 %. Результаты по исследованию переваримости белка изучаемых штаммов показали, что она составляет 54,2 % для штамма MZ-22 и 61,4 % для штамма Ls C-Q, что характерно для многих других грибов в связи с присутствием в тканях грибной клетчатки и хитина.

Количественное исследование липидов показало наличие их от 20,07 до 29,35 % в мицелии исследуемых штаммов. Максимальное содержание липидов отмечено в мицелии штамма Ls C-Q (29,35 %), тогда как в мицелии Ls 1-06 только 20,07 и MZ-22 – 21,33 %. Ненасыщенные жирные кислоты составляют более 50 % от общего количества липидов с преобладанием олеиновой кислоты (таблица 1).

Таблица 1 – Состав жирных кислот липидных фракций штаммов *Laetiporus sulphureus*

Жирная кислота	Содержание в %		
	Ls 1-06	LsC-Q	MZ-22
C ₁₁ H ₂₃ COOH(лауриновая кислота)	-	-	0,4
C ₁₃ H ₂₇ COOH(тетрадекановая кислота)	2,17	2,23	1,4
C ₁₄ H ₂₉ COOH (пентадекановая кислота)	0,49	0,25	0,6
C ₁₅ H ₂₉ COOH(пальмитолеиновая кислота)	0,83	0,38	1,14
C ₁₅ H ₃₁ COOH (пальмитиновая кислота)	23,18	36,09	32,07
C ₁₆ H ₃₃ COOH (маргариновая кислота)	0,91	0,19	0,64
C ₁₇ H ₃₁ COOH(линолевая кислота)	22,60	15,28	23,72
C ₁₇ H ₃₃ COOH(олеиновая кислота)	26,10	34,86	26,39
C ₁₇ H ₃₅ COOH (стеариновая кислота)	19,02	8,94	9,88
C ₁₉ H ₃₉ COOH(эйкозановая)	0,73	0,64	0,75
C ₂₁ H ₄₃ COOH(докозановая кислота)	0,67	0,21	0,48
C ₂₉ H ₅₉ COOH(трикозановая кислота)	0,58	0,12	0,60
C ₂₃ H ₄₇ COOH (лигноцериновая кислота)	0,48	0,21	1,68
C ₁₉ H ₃₇ COOH (11-эйкозеновая кислота)	0,56	0,22	–
C ₁₇ H ₃₃ COOH (элаидиновая кислота)	0,82	–	–

В мицелии всех штаммов *Laetiporus sulphureus* присутствует ненасыщенная линолевая кислота, содержание которой составляет от 15,28 до 23,72 % от общего числа жирных кислот. Для мицелия штамма MZ-22 ее количество максимальное. Из насыщенных жирных кислот содержание пальмитиновой кислоты наибольшее (от 23,18 до 36,09 %). Следует отметить, что при исследовании плодовых тел *L. sulphureus* С.В. Агафоновой и мицелия *L. sulphureus* Т.С. Гвоздковой, В.В. Щербой и А.Н. Капичем установлено преобладание незаменимой линолевой кислоты от 50 до 70 %, в отличие от количества в мицелии изучаемых нами штаммов.

Биологическую активность грибов связывают с наличием в них углеводов. Исследования углеводного состава штаммов *Laetiporus sulphureus* показали, что наибольшее их количество отмечено в мицелии штамма MZ-22 (28,7 %) (таблица 2).

Из таблицы видно, что количество легкогидролизуемых полисахаридов значительно выше, чем трудногидролизуемых.

Таблица 2 – Доля углеводов в мицелии изучаемых штаммов *Laetiporus sulphureus*

Штаммы <i>Laetiporus sulphureus</i>	Водорастворимые углеводы	Легкогидролизуемые полисахариды	Трудногидролизуемые полисахариды
Ls 1-06	2,1±0,18	19,8 ±0,9	6,0±0,14
Ls C-Q	2,2±0,05	19,3±1,1	5,03±0,12
MZ -22	1,5±0,04	20,4±0,8	6,8±0,21

Наиболее важный признак – способность к биосинтезу каротиноидов – является основным показателем для отбора штаммов-продуцентов *L.sulphureus*. Известно, что каротиноиды синтезируют и другие организмы: грибы *Phycomyces blakesleanus*, *Rhodotorula glutinis*, *Mucor rouxii*, *Blakeslea trispora*, бактерии *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhododmicrobium acidophila*, *Chloroflexis spp.*, водоросли рода *Danaliella*, растения *Lycopersicon spp.* Получение каротиноидов из перечисленных продуцентов имеет ряд недостатков: низкий выход действующего вещества, большие потери при очистке, либо применение токсичных стимуляторов синтеза каротиноидов, или токсичность самой получаемой каротиноидной биомассы. Следует также отметить, что химическое строение каротиноидов растений, грибов и бактерий различное, что отличает и степень их биологической активности. Важным преимуществом штаммов-продуцентов *L.sulphureus* является наличие в его составе редкого соединения кислого каротиноида – летипоровой кислоты, которое было исследовано рядом зарубежных авторов (Weber R.W.S, Davoli P., 2004, 2006 гг.), и определяет высокие иммуномодулирующие, антиоксидантные и противоопухолевые свойства этого вида макромицета. Наряду с этим, *L.sulphureus* – съедобный гриб, не патогенен, не вызывают аллергии и нетоксичен. В наших исследованиях методом пересчета на β-каротин установлено, что содержание каротиноидов в биомассе мицелия штаммов от 2,12 до 3,58 мг % и максимально в мицелии штамма *L.sulphureus* MZ-22.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS*

Перспективным и доступным методом определения безопасности пищевых продуктов и источников биологически активных веществ считают метод биотестирования с использованием простейших – инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium caudatum* и др.

На первом этапе определяли степень токсичности водных и спиртовых экстрактов мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* на *Paramecium caudatum*. Результаты показали, что водные экстракты мицелия штаммов (мицелий : вода – 1:30) нетоксичны при соотношении экстракт:вода – 1:5 для штаммов Ls 1-06 и Ls C-Q, тогда как для штамма MZ-22 – только 1:10. Спиртовые экстракты мицелия всех штаммов *Laetiporus sulphureus* (1 % спирт) нетоксичны при

содержании сухих веществ 0,02 % в экстракте (коэффициент прироста клеток *Paramecium caudatum* составил от 3,07 до 3,15).

На втором этапе исследований на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* использовали разведение водных и спиртовых экстрактов мицелия в соотношении, которые являлись нетоксичными для *Paramecium caudatum*.

Биологически активные вещества, влияющие на жизнеспособность инфузорий, содержатся у всех штаммов *Laetiporus sulphureus* в достаточно большом количестве (коэффициент прироста клеток составил от 13 до 18 для водных экстрактов и от 10 до 13 для спиртовых экстрактов). В связи с этим, по результатам биотестирования все штаммы можно считать нетоксичными.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS* В ПОГРУЖЕННОЙ КУЛЬТУРЕ

По результатам исследований можно сделать заключение, что все исследуемые штаммы *Laetiporus sulphureus* имеют довольно высокую скорость роста, нетоксичны и содержат в своем составе биологически активные вещества. В связи с этим, их можно рассматривать как перспективные объекты для создания биологически активных добавок. Оптимизация питательной среды для культивирования – важная часть для биотехнологии продуцентов биологически активных соединений *Laetiporus sulphureus*, которую проводили в два этапа: методом полного факторного эксперимента.

При оптимизации за основу использовали глюкозо-пептонную среду, в которой пептон в среде заменяли на молочную сыворотку, следующего состава: глюкоза - 10г/л, молочная сыворотка - 21 г/л, KH_2PO_4 - 0,6 г/л, K_2HPO_4 – 0,4 г/л, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 1 мг/л, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 мг/л, $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - 50 мг/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,48г/л, CaCl_2 – 0,5 г/л. В качестве варьирующих факторов в среде брали глюкозу, молочную сыворотку и $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.

В результате проведенной оптимизации было установлено, что зависимость выхода биомассы у штаммов *Laetiporus sulphureus* при различном уровне содержания питательных веществ в среде неодинакова. Так, для штаммов Ls 1-06 и MZ-22 наибольший выход биомассы (5,85 г/л и 5,6 г/л соответственно) наблюдается при максимальном уровне содержания питательных веществ в среде, для штамма Ls C-Q – при максимальном уровне содержания глюкозы и молочной сыворотки и минимальном – соли марганца (12,96 г/л). Установлено, что наиболее продуктивный штамм – Ls C-Q, выход биомассы которого повысился от 2,75 до 12,96 г/л на АСБ. Такие данные свидетельствуют о сильной зависимости штамма роста биомассы от уровня содержания питательных веществ в среде.

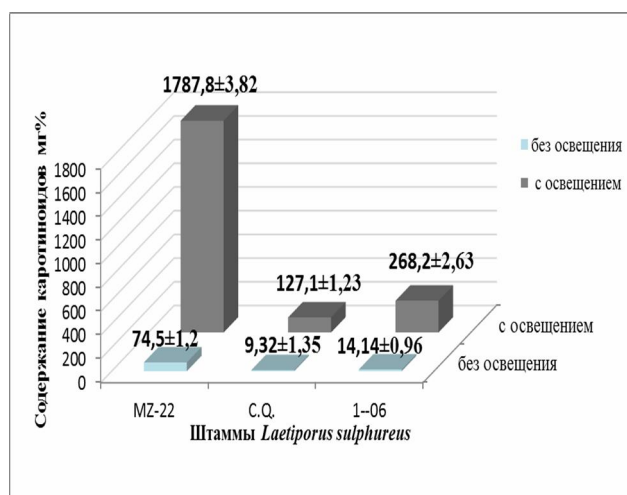
При подборе оптимальной среды, для культивирования *L. sulphureus* важно было учесть и уровень каротиноидов в биомассе мицелия, т.к *Laetiporus sulphureus*, как отмечалось выше, единственный на сегодняшний день

съедобный базидиомицет, синтезирующий каротиноид редкого строения – летипоровую кислоту. Анализ показал, что наибольший выход каротиноидов в пересчете на АСБ отмечен на средах с минимальным уровнем молочной сыворотки в питательной среде для штаммов Ls 1- 06, Ls MZ- 22 и максимальном ее уровне для штамма Ls C-Q. Наибольшее накопление каротиноидов наблюдается у штамма MZ-22 (от 6,06 мг % до 45,71мг %), минимальное – у штамма Ls C-Q (1,57-5,88 мг %).

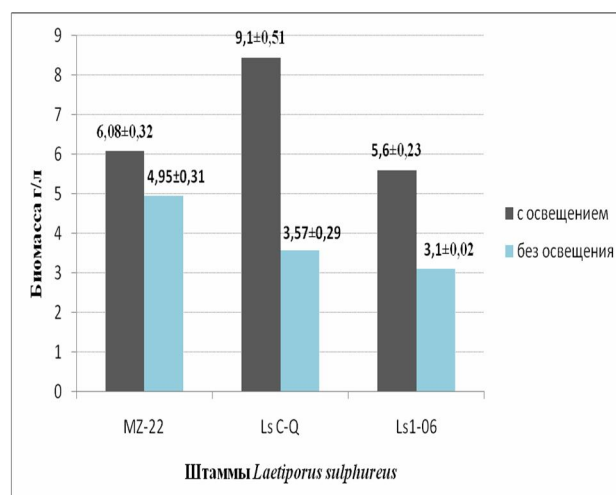
Как известно, для извлечения каротиноидов используют полярные растворители (Кретович В.Л.,1986). Для выбора наиболее подходящего растворителя исследования проводили с экстрагентами: ацетон, 96 % этанол, смесь хлороформ:этанол:вода (1:2:0,8 по объему). В результате исследований было установлено, что лучший экстрагент – этанол 96 %. При экстракции 96%-м этанолом количество экстрагируемых каротиноидов максимально и выше в 1,5-1,7 раз чем при экстракции ацетоном. Так, для штамма MZ-22 экстракция каротиноидов увеличилась с 45, 71 мг % до 74,5 мг %.

Влияние освещения на рост биомассы и биосинтез каротиноидов у штаммов *Laetiporus sulphureus*

Рядом авторов (Бэккер З.Э., 2003; Гвоздкова Т.С., 2003) установлено, что свет стимулирует образование пигментов в мицелии грибов. В наших исследованиях определено, что при погруженном жидкофазном культивировании количество каротиноидов в мицелии всех штаммов в условиях освещения увеличивается в 14-24 раза в сравнении с контролем (рисунки 3а и 3б). Наибольшая разница в накоплении каротиноидов была отмечена у штамма MZ-22 и составила 1787,8 мг %.



а



б

Рисунок 3 – Влияние освещенности на биосинтез каротиноидов (а) и прирост биомассы (б) штаммами *Laetiporus sulphureus*

Кроме того, в условиях освещения увеличился выход биомассы у всех штаммов *Laetiporus sulphureus* в 1,2-2,3 раз. Следует указать, что достоверного положительного влияния при культивировании на агаровых средах отмечено не было.

Биомасса, полученная в условиях погруженного культивирования с освещением продуцента, отличалась яркой красно-оранжевой окраской по сравнению с биомассой, полученной при культивировании без света, цвет мицелия которого был светло-оранжевым.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИЦЕЛИЯ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS*

Оценка биологической активности (антимикробной, противоопухолевой) и токсичности позволяет дать объективную оценку возможности их использования в биотехнологии биомассы мицелия и биологически активных веществ. Кроме того, такие показатели позволяют сравнить выделенные штаммы с древостоев хвойных со штаммами *L.sulphureus*, выделенными с лиственных пород и уже рекомендованными для получения биологически активных добавок, таких как, например, «Летипорин» в Белоруссии.

Антиоксидантная емкость

Антиоксидантная емкость является важным показателем биологической активности и позволяет рекомендовать полученную биомассу мицелия для использования в различных областях: для получения пищевых и кормовых добавок, биологически активных веществ.

В наших исследованиях установлено, что при культивировании в условиях освещения и в темноте количество каротиноидов в экстрактах мицелия неодинаково. В связи с чем, оценивали антиоксидантную емкость в экстрактах различных партий мицелия, полученного при погруженном культивировании на оптимизированной по выходу каротиноидов среде с освещением и без освещения.

Наибольшей антиоксидантной емкостью обладает гидрофильная фракция. В условиях освещения антиоксидантная активность штаммов увеличивается в среднем в 2 раза для гидрофильной фракции и 3-5 раз для липофильной. Максимальная активность образцов мицелия отмечена у штамма MZ-22, минимальная – у Ls C-Q. Однако следует отметить, что липофильная фракция этого штамма обладает большей активностью по сравнению с другим (таблица 3).

Таблица 3 – Антиоксидантная ёмкость мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus*

Штамм <i>Laetiporus sulphureus</i>	Антиоксидантная емкость, мкмоль ТЭ (эквиваленты тролокса)/г.			
	Экстракт мицелия, полученного без освещения		Экстракт мицелия, полученного с освещением	
	Гидрофильная фракция	Липофильная фракция	Гидрофильная фракция	Липофильная фракция
MZ-22	41,30±2,11	7,63±0,31	78,64±2,25	24,27±2,72
	Общая АЕ/г 48,93±2,42		Общая АЕ/г 102,91±4,97	
L.s. C-Q	22,06±1,02	6,3711 ± 0,2931	37,37±1,83	32,60±2,14
	Общая АЕ/г 28,43±1,31		Общая АЕ/г 69,97±3,97	
L.s. 1-06	32,95±1,0732	5,0370 ± 1,2351	50,12±2,01	20,35±1,36
	Общая АЕ/г 37,98±2,3		Общая АЕ/г 70,47±3,37	

Таким образом, при культивировании в условиях освещения увеличивается биосинтез каротиноидов, что доказывает зависимость значений антиоксидантной емкости от количества пигмента в биомассе мицелия штаммов.

Антимикробная активность штаммов *Laetiporus sulphureus*

Изучение культуральных жидкостей, содержащих продукты метаболизма штаммов гриба *Laetiporus sulphureus*, и спиртовые экстракты мицелия (в 30% спирте) оценивали на тест-культурах грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* М 17 и *Salmonella typhimurium* 79 и грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 6538-Р и *Listeria monocytogenes* 766. Исследования показали, что все используемые тест-культуры с разной степенью чувствительны к метаболитам штаммов *Laetiporus sulphureus*. Наибольшая антимикробная активность культуральных фильтратов и спиртовых экстрактов отмечена для штамма – Ls 1-06. Зоны подавления роста тест-культур составляют от 9 до 16 мм. Лучше всего штаммы подавляют рост грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*. Культуральные фильтраты в основном проявляют бактериостатическое действие, тогда как спиртовые экстракты – бактерицидное.

В связи с тем, что штамм Ls 1-06 *Laetiporus sulphureus* обладает высокими антимикробными и антиоксидантными свойствами, представляло интерес изучить возможность использования его мицелия для повышения антиоксидантной емкости молочного продукта. Проведенные исследования по влиянию добавки мицелия *Laetiporus sulphureus* показали значительное

увеличение антиоксидантной активности ЗЦМ по сравнению с контролем [Ким И. А., 2011].

Учитывая, что штамм *Ls 1-06* проявляет перечисленные свойства, целесообразно предложить его для обогащения кисломолочных продуктов в сочетании с пробиотическими культурами, оказывающими положительное влияние на микрофлору человека и проявляющими антагонистическую активность против условно-патогенных микроорганизмов. Для этого исследовали влияние штамма *Ls 1-06 Laetiporus sulphureus* на пробиотическую культуру *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44, часто применяемую при производстве кисломолочных продуктов и обладающие высокой антимикробной активностью.

Исследованиями установлено, что при добавлении к закваске биомассы штамма *Ls 1-06 Laetiporus sulphureus* в сочетании с пробиотической культурой *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44 значение кислотности изменяется более интенсивно по сравнению с контрольным образцом, где в качестве закваски была только монокультура *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44. Численность клеток (КОЕ/г) в закваске, в состав которой вносили биомассу гриба *Laetiporus sulphureus*, через 4 часа с момента заквашивания была больше, чем в контрольном образце. Отмечено, что штамм *Ls 1-06 Laetiporus sulphureus* в сочетании с пробиотической культурой АСТ-44 влияет на скорость сквашивания молока, что приводит к увеличению кислотности до рН=4,35. Присутствие в молоке добавки мицелия штамма *Ls 1-06 Laetiporus sulphureus* незначительно влияет на рост и развитие пробиотической культуры *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44.

Таким образом, можно утверждать, что введение биомассы мицелия штамма *Ls 1-06 Laetiporus sulphureus* не ингибирует рост пробиотической культуры *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44, что позволяет рекомендовать его для обогащения молочных продуктов ценными аминокислотами и биологически активными веществами, обладающими антиоксидантной и антимикробной активностью.

Противоопухолевая активность штамма *Laetiporus sulphureus*

Учитывая, что наибольшей антиоксидантной активностью среди изучаемых штаммов *Laetiporus sulphureus* обладает штамм MZ-22, исследовали противоопухолевую активность спиртовых экстрактов биомассы мицелия, содержащей 17,9 мг/г каротиноидов, на линии клеток Сасо-2.

Результаты показали, что штамм MZ-22 обладает противоопухолевым действием на линию опухолевых клеток Сасо-2 при концентрации сухого вещества в экстракте (25 % спиртовой) 0,1 %. При этом цитотоксический эффект составляет 79 %. Такой высокий показатель активности при низкой концентрации сухого вещества открывает возможности для дальнейшего изучения штамма в качестве источника противоопухолевых соединений. Основным компонентом, обеспечивающим биологическую активность экстрактов, вероятно, следует считать каротиноиды в мицелии штамма MZ-22.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММОВ *LAETIPORUS* *SULPHUREUS*

Влияние соли селена на рост мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus*

Широкое использование базидиомицетов обусловлено их способностью сорбировать микроэлементы, в частности селен. Проблема недостаточности селена в питании привлекает в настоящее время повышенное внимание, поэтому разработка селеносодержащих биологических добавок становится все более актуальной (Савченко М.Ф., 2001). Искусственное снабжение организма селеном при его пищевом дефиците может осуществляться: в форме неорганического селена (селенита или селената натрия); в форме органических соединений селена микробного, либо дрожжевого происхождения. Одной из основных форм существования органического селена в грибных тканях является селенметионин.

На основании всего выше указанного целью исследования было получение биомассы мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* с повышенным содержанием органического селена. На первом этапе исследовали рост штаммов *Laetiporus sulphureus* при различных концентрациях соли селена на агаризованной капустной среде (15 мг/л, 20 мг/л, 25 мг/л селена). Результаты исследований показали, что с повышением концентрации соли селена в среде замедляется рост колоний продуцентов. Концентрация селена 15 мг/л в меньшей степени снижает ростовые показатели штаммов. Ростовый коэффициент у штаммов составлял от 24 до 51 и среднесуточная скорость роста 3,67 - 6,2 мм/сут. Следует отметить, что лучше всего на среде с селеном (15 мг/л) растет штамм MZ-22.

При статическом культивировании штаммов *Laetiporus sulphureus* на жидкой питательной среде при концентрации селена 15, 20 и 25 мг/л биомасса мицелия на 30-е сутки культивирования снижается у штаммов Ls 1-06 и MZ-22. Полностью ингибируется рост для штамма Ls C-Q при концентрациях селена в среде 20 и 25 мг/л.

Наиболее устойчив к соли селена в питательной среде штамм MZ-22, поэтому его использовали для разработки способа получения мицелия, содержащего селен. Как показали исследования (таблица 4), больше всего селена содержится в мицелии, культивируемом на среде с концентрацией 25 мг/л и составляет 4,50 мкг/г АСБ, однако разница накапливаемого селена мала между его количеством, полученным после культивирования на среде с 25 мг/л и с 15 мг/л селена. Учитывая, что показатели накопления биомассы выше на среде с 15 мг/л селена, такую концентрацию целесообразнее использовать для получения селеносодержащего мицелия. Разработанный способ позволяет обогатить биодоступным селеном мицелий штамма.

Таблица 4 – Количество селена в мицелии штамма MZ-22 *Laetiporus sulphureus*

№ п /п	Количество селена в питательной среде, мг/л	Количество селена в мицелии после культивирования, мкг\г
1	0	0,01±0
3	15	4,25±0,12
4	20	4,38±0,26
5	25	4,50±0,14

Исследования токсичности на простейших *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis* водного и спиртового экстрактов селенсодержащего мицелия штамма MZ-22 показали, что они безопасны в тех же концентрациях, что и экстракты мицелия, не обогащенного селеном. Способ получения мицелия, обогащенного селеном защищен патентом (№ 2473679).

Твердофазное культивирование штаммов *Laetiporus sulphureus*

Перспективным способом получения мицелия грибов – источников биологически активных соединений – может быть твердофазная ферментация растительных материалов. Обогащение растительных субстратов путем биоконверсии базидиомицетами, обладающими ценными свойствами и биохимическим составом, может представлять интерес для кормопроизводства. Для твердофазного культивирования штаммов *Laetiporus sulphureus* использовали отходы сельского хозяйства, такие как подсолнечная лузга, опилки хвойных пород деревьев, а также смесь злаковых (пшеница, просо, овес), которые используют для приготовления комбикормов.

Рост штаммов *Laetiporus sulphureus* был отмечен на всех растительных субстратах, однако с различными показателями. Наиболее быстро колонизировали мицелием штаммы подсолнечную лузгу. Оценка динамики роста мицелия на указанном растительном субстрате показала, что максимальный диаметр колоний штаммов на нем достигается на 10 сутки культивирования для штамма MZ-22; на 11 - для штамма Ls C-Q и 13 – Ls 1-06. Однако мицелий формировался очень слабый, неплотный, в отличие от мицелия, выращенного на смеси злаковых культур. Именно на нем наблюдается самый высокий ростовой коэффициент (48,0-215).

Таким образом, наилучшим растительным субстратом из исследуемых может считаться смесь злаковых культур. Учитывая, что такой растительный субстрат используется в качестве кормов в птицеводстве, целесообразно определить содержание в нем белка и липидов, после культивирования штаммов *Laetiporus sulphureus*. По данным биохимического анализа получены результаты, приведенные в таблице 5.

Таблица 5 – Общее содержание белков и липидов в препарате, полученном после биоконверсии штаммами *Laetiporus sulphureus*

Штамм <i>Laetiporus sulphureus</i>	Ls C-Q	Ls 1-06	MZ-22	Контроль (субстрат)
белок, %	33,95±1,2	29,78±1,6	18,53±0,8	10,77±0,5
липиды, %	19,24±0,8	15,29±1,2	10,43±0,6	6,51±0,6

Штамм Ls C-Q в большей мере обогащает растительный субстрат белками и липидами (33,95 % и 19,24 % соответственно), поэтому он может быть рекомендован в качестве продуцента для биологической трансформации смеси злаковых культур.

ВЫВОДЫ

1. В результате исследования культурально-морфологических, микроморфологических и генетических свойств штаммов, выделенных из плодовых тел пораженных хвойных древостоев *Larix sibirica* L., установлена их принадлежность к виду *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill.

2. Исследования биохимического состава показали, что мицелий штаммов *Laetiporus sulphureus* Ls-06, MZ-22 и Ls C-Q может быть источником белка, в составе которого, наибольшее количество незаменимых аминокислот приходится на триптофан, треонин, лизин и валин, и ненасыщенных жирных кислот (линолевая и олеиновая).

3. Штаммы *L. sulphureus*, выделенные с древостоев хвойных, синтезируют соединения каротиноидной природы, количество которых в мицелии зависит от условий культивирования и от биологических особенностей продуцента. В условиях максимального роста биомассы отмечен более низкий уровень накопления каротиноидов для всех исследуемых штаммов. Наибольший выход каротиноидов достигается при культивировании в условиях освещения 500 люкс у штамма MZ-22 и составляет 17,9 мг/г.

4. Антиоксидантная активность гидрофильной и липофильной фракций мицелия штаммов зависит от количества каротиноидов в биомассе мицелия штаммов и максимально составляет 102,91 мкмоль ТЭ/г.

5. Для максимального накопления каротиноидов в мицелии штамма MZ-22 разработан состав питательной среды, содержащей г/л: глюкозу - 15; молочную сыворотку - 15; $MnSO_4 \times 5H_2O$ - 0,05. Для получения биомассы штамма *L. sulphureus* Ls C-Q разработана питательная среда состава, г/л: глюкоза - 15; молочная сыворотка - 27; $MnSO_4 \times 5H_2O$ - 0,05.

6. Спиртовые экстракты и культуральные фильтраты штаммов-ксилотрофов хвойных *L. sulphureus* являются источником биологически активных соединений, обладающих антимикробной активностью в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий. Экстракты мицелия штамма MZ-22 *L. sulphureus* оказывают цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки Caco-2.

7. Установлено влияние различной концентрации соли селена на показатели роста мицелия штаммов *L. sulphureus* на твердых питательных средах и продуктивность биомассы при статическом жидкофазном культивировании. Показана возможность получения селенсодержащего препарата на основе мицелия штамма *Laetiporus sulphureus* MZ-22 на среде, содержащей 15 мг/л селена. Связанный в биомассе селен не влияет на токсичность мицелия, что позволяет получать селенсодержащий препарат как биологически активную добавку.

8. Показана возможность твердофазного культивирования штаммов на различных растительных субстратах, оптимальный состав представляет смесь злаковых культур (овес, пшеница, просо). Штамм Ls C-Q рекомендован в качестве продуцента для биологической трансформации смеси злаковых культур и получения кормовой добавки.

9. На культурах клеток простейших доказана нетоксичность мицелия штаммов. Обоснована целесообразность применения препарата мицелия штамма *Laetiporus sulphureus* Ls 1-06 для повышения антиоксидантной активности молочных продуктов. Показано, что введение препарата мицелия штамма *Laetiporus sulphureus* Ls 1-06 не влияет на активность и численность пробиотической культуры *Lactobacillus acidophilus* АСТ-44 при культивировании в молочном продукте.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Иванова И.Е. Изучение продуктивности и биологической активности нового штамма Ls 1-06 *Laetiporus sulphureus* (Bull. fr) Bond. et. Sing // Иммунология, Аллергология, Инфектология.-Москва- 2010.- №1.- с.251.

2. Иванова И.Е. Влияние штамма Ls 1- 06 *Laetiporus sulphureus* на пробиотическую культуру *Lactobacillus acidophilus* АТ-44 //Молочная промышленность.- Москва.-2011.- №12, с.54.

3. Громовых Т.И., Иванова И.Е., Торкова А.А. Культивирование мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* для получения кормовой добавки для птиц // Вестник РАСХН-Москва, 2012.№ 6.С-53-55.

4. Патент на изобретение № 2011115880. Способ получения селенсодержащего препарата биомассы *Laetiporus sulphureus* MZ-22. Авторы: Громовых Т.И. Салохина О.Э., Иванова И.Е., Жаринов А.И., Сидаков Т.А. Заявка № 211115880/10(023650).27.01. 2013. Бюлл. №3.

5. Иванова И.Е. Изучение продуктивности и биологической активности нового штамма гриба Ls 1-06 *Laetiporus sulphureus* (Bull. fr) Bond. et. Sing // Материалы VII Международной конференции «Экологические безопасные ресурсосберегающие технологии и средства переработки сельскохозяйственного сырья и производства продуктов питания» –Москва.– 2009.- С.16-18.

6. Иванова И.Е., Громовых Т.И. Изучение продуктивности штаммов *Laetiporus sulphureus* (Bull.fr) Bond.et.Sing // Материалы 9-ой международной

научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения», 2010.- С.150-151.

7. Иванова И.Е., Громовых Т.И. Антимикробные и антиоксидантные свойства нового штамма гриба *Laetiporus sulphureus* // Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее». Москва, 2011.- С.35.

8. Иванова И.Е., Громовых Т.И. Изучение свойств и биохимического состава штамма MZ-22 *Laetiporus sulphureus* // Материалы V международной научно-технической конференции «Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке». Санкт-Петербург, 2011.- С.375-377.

9. Иванова И.Е. Биологически активные вещества мицелия штамма Z-22 *Laetiporus sulphureus*/Материалы IX Международной научно-практической конференции «Технологии и продукты здорового питания. Функциональные продукты питания». Москва, 2011 С.184-187.

10. Иванова И.Е., Громовых Т.И. Оптимизация питательной среды для культивирования штаммов *Laetiporus sulphureus* // Материалы 10-й международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения». Москва, 2011.- С.75-77

11. Иванова И.Е., Громовых Т.И., Федосенко А.С. Твердофазное культивирование штаммов *Laetiporus sulphureus* // Материалы конф. «Достижения и перспективы развития биотехнологии». Саранск, 2012.С.63-64.

12. Иванова И.Е., Громовых Т.И., Черемных Е.Г. Биологическая активность штамма гриба Ls C-Q *Laetiporus sulphureus* (Bull) Murrill // Современная микология России . Москва, 2012.-Т.3.- С.376-377.

13. Иванова И.Е., Громовых Т.И. Влияние внешних факторов на рост и морфологию штаммов *Laetiporus conifericola* // Материалы VIII международной научно-практической конференции «Наука и инновации-2012». Польша, 2012. - С.6-9.

14. Иванова И.Е., Громовых Т.И. Влияние света на биосинтез каротиноидов и антиоксидантные свойства штаммов *Laetiporus conifericola* (Burd and Vanik) // Материалы 11-ой международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения». М, 2012.- С.-6-8.

15. Садыкова В.С., Свирщевская Е.В., Громовых Т.И., Иванова И.Е., Попова Е.С., Катруха Г.С., Федорова Г.Б. Противоопухолевая активность метаболитов штаммов *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* и *Laetiporus sulphureus* // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине III международная научно-практическая конференция. Казань, 2012.–С.379-380.