

УДК 579.22:582.28

Т. А. ПУЧКОВА<sup>1</sup>, О. В. ОСАДЧАЯ<sup>1</sup>, А. А. КОСТЕНЕВИЧ<sup>1</sup>, В. У. БУКО<sup>2</sup>

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
ГРИБА ВЕСЕЛКА ОБЫКНОВЕННАЯ (*PHALLUS IMPUDICUS* L. EX PERS.)  
ПРИ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO***

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: tatiashi@mail.ru

<sup>2</sup>Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Беларусь,  
e-mail: buko@bioch.basnet.by

Исследованы культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства нового штамма гриба *Phallus impudicus* 5. Подбор состава питательной среды и условий культивирования позволил увеличить выход биомассы в 1,3 раза, содержание в ней эндополисахаридов – в 1,5, экзополисахаридов – в 1,7 раза. В мицелии содержалось 50–54 % общих углеводов, 13–14 % эндополисахаридов, 7–11 % хитина, 20–21 % сырого протеина, 12–13 % истинного белка, 2–2,3 % липидов, 0,46–0,82 % общих фенольных соединений. Проведено сравнительное изучение химического состава мицелия и плодовых тел *Ph. impudicus*.

*Ключевые слова:* *Phallus impudicus*, условия культивирования, полисахариды.

T. A. PUCHKOVA, O. V. OSADCHAYA, A. A. KASTSIANEVICH, V. U. BUKO

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF STINKHORN FUNGUS  
(*PHALLUS IMPUDICUS* L. EX PERS.) AT CULTIVATION *IN VITRO***

<sup>1</sup>Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, e-mail: tatiashi@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences, Grodno, Belarus,  
e-mail: buko@bioch.basnet.by

Cultural-morphological and physiological-biochemical properties of new fungal strain *Phallus impudicus* 5 were studied. Optimization of nutrient medium composition and cultural conditions enabled to increase biomass yield by 1.3 times, contents of endopolysaccharides by 1.5 times and exopolysaccharides by 1.7 times. The mycelium comprised 50–54 % of total carbohydrates, 13–14 % of endopolysaccharides, 7–11 % of chitin, 20–21 % of crude protein, 12–13% of true protein, 2–2.3 % of lipids, 0.46–0.82 % of total phenolic compounds. Comparative analysis of chemical composition of *Ph. impudicus* mycelium and fruit bodies was performed.

*Keywords:* *Phallus impudicus*, cultivation conditions, polysaccharides.

**Введение.** Гриб веселка обыкновенная (*Phallus impudicus* L. ex Pers.) встречается в лесах Европы, Кавказа, Сибири и Дальнего Востока. Веселка издавна используется в народной медицине стран Восточной Европы для лечения заболеваний кожи, желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, онкологических заболеваний [1, 2]. Этот гриб довольно редко встречается в природе, поэтому до сих пор изучен недостаточно.

В настоящее время установлено, что плодовые тела веселки, произрастающей в лесах Беларуси, обладают широким спектром биологической активности. В опытах на лабораторных животных показано, что употребление экстрактов *Ph. impudicus* оказывает противоопухолевое, радиопротекторное [3, 4], иммуномодулирующее, гипогликемическое, ранозаживляющее действие [5, 6].

Считается, что противоопухолевая активность *Ph. impudicus* обусловлена полисахаридами, представляющими собой глюкоманнаны [7].

Поскольку ресурсы *Ph. impudicus* в природе ограничены, представляет интерес изучение физиолого-биохимических свойств гриба, что позволит в дальнейшем разработать технологию его выращивания для получения биологически активных соединений.

Цель исследования – изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств нового штамма гриба *Ph. impudicus*, исследование влияния условий культивирования на его рост и образование полисахаридов, сравнение химического состава мицелия и плодовых тел.

**Объекты и методы исследования.** Объектами изучения являлись штаммы гриба *Ph. impudicus* (хранятся в коллекции культур лаборатории экспериментальной микологии и биоповреждений Института микробиологии НАН Беларуси), которые выделяли из плодовых тел, собранных в лесах Гродненской и Минской областей Республики Беларусь. Штамм гриба *Ph. impudicus* 5 отобран в результате скрининга штаммов *Ph. impudicus* по скорости роста на стандартных агаризованных и жидких питательных средах и образованию полисахаридов.

Штаммы *Ph. impudicus* поддерживали на скошенном сусло-агаре (СА) (4 °Б). Изучение культурально-морфологических свойств, определение линейной скорости роста и ростового коэффициента *Ph. impudicus* 5 проводили при выращивании в чашках Петри на СА (8 °Б), глюкозо-пептонном агаре (ГПА) и картофельно-глюкозном агаре (КГА) по [8]. Влияние температуры на рост гриба изучали при его выращивании на ГПА в диапазоне температур от 4 до 30 °С.

Для проведения качественных цветных реакций на наличие ферментативной активности гриб выращивали на ГПА. Использовали методы и реактивы, описанные в [9, 10]. Наличие ферментативной активности выявлялось при разрушении веществ среды, что проявлялось в ее помутнении, просветлении или изменении окраски.

Культивирование на жидких средах осуществляли в колбах Эрленмейера на пивном сусле 8 °Б или полусинтетической глюкозо-пептонной среде следующего состава, г/л: глюкоза – 20, пептон – 3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,  $\text{MgSO}_4$  – 0,25, кукурузный экстракт – 2. Количество инокулюма – 10 % по объему. Поверхностное культивирование грибного мицелия проводили в стационарных условиях. Глубинное культивирование осуществляли на круговой качалке (скорость вращения – 120 об/мин).

Для оценки влияния компонентов питательной среды на рост и образование полисахаридов грибом *Ph. impudicus* в качестве основы использовали жидкую глюкозо-пептонную среду, в составе которой соответствующие источники углерода или азота заменяли другими в эквивалентных количествах.

Грибной мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через плотную ткань, высушивали при температуре 60 °С и анализировали. Белок в мицелии определяли по Кьельдалю [11], общие углеводы – фенол-серноокислотным методом [12], эндополисахариды – по [13], экзополисахариды – по [14], хитин-глюкановый комплекс – по методу Кюршнера и Ганека [15], липиды – по Фолчу [16], сумму моно- и полифенолов определяли с реактивом Фолина–Дениса [17].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических функций Microsoft Excel.

**Результаты и их обсуждение.** При выращивании на агаризованных питательных средах (СА, ГПА, КДА) *Ph. impudicus* 5 образовывал плотные, опушенные колонии белого цвета с концентрическими кругами, высоким ватообразным мицелием, выпуклым центром, слегка волнистым краем. Реверзум колоний цвета среды. Мицелий обладал приятным грибным запахом. Мицелий *Ph. impudicus* 5 быстрее рос на ГПА, чем на СА. Максимальная линейная скорость роста при 24 °С составила 1,15–1,2 мм/сут, ростовой коэффициент – 10,8.

Более благоприятным для роста исследуемого штамма оказался диапазон температур 20–26 °С, а оптимум составил 22–24 °С. При 30 °С и выше рост мицелия прекращался.

Путем проведения качественных цветных реакций в культуре *Ph. impudicus* 5 выявлено наличие ферментов углеводного (амилаза, целлюлаза, ксиланаза, глюкозидаза), азотного (протеаза, нитрат-редуктаза) и липидного (липаза) обмена, а также ферментов окислительно-восстановительных процессов (лакказа, тирозиназа).

При микроскопировании вегетативного мицелия *Ph. impudicus* 5 ( $\times 400$ ) наблюдались септированные, разветвленные, переплетающиеся в разных направлениях гифы, а также слияния гиф, осуществляющиеся с помощью анастомозов. Встречались крупные, вздутые, часто неправильной формы клетки, в которых находились сферические кристаллы. На мицелии присутствовали пражки.

При поверхностном культивировании в колбах при стационарных условиях мицелий гриба *Ph. impudicus* 5 образовывал на поверхности питательной среды пленку белого цвета. Для получения 5,0–8,0 г/л поверхностного мицелия требовалось более 30 сут культивирования. В фильтрате культуральной жидкости содержалось до 2,0 г/л экзополисахаридов.

При глубинном культивировании в колбах на качалке в условиях перемешивания мицелий *Ph. impudicus* 5 рос в виде пеллет диаметром 1–5 мм. На жидком пивном сусле 8 °Б *Ph. impudicus* 5 за 14 сут культивирования накапливал 4,8–5,0 г/л биомассы, содержащей 8,6–9,4 % эндополисахаридов. В культуральной жидкости присутствовало 2,5–3,0 г/л экзополисахаридов.

Изучение влияния состава питательной среды на рост *Ph. impudicus* 5 показало, что лучшими источниками углерода являются глюкоза и мальтоза, а азота – дрожжевой и кукурузный экстракты. Добавление растительного масла (1 г/л) и тиамин (0,5 мг/л) незначительно стимулировало рост гриба. Повышение содержания глюкозы в среде до 40 г/л и дрожжевого экстракта до 5,0 г/л способствовало увеличению выхода биомассы до 10,0 г/л, содержания в ней эндополисахаридов – до 12–14, экзополисахаридов – до 4,0–5,0 г/л. Для культивирования *Ph. impudicus* 5 подобрана полусинтетическая питательная среда следующего состава, г/л: глюкоза – 40, дрожжевой экстракт – 5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,  $\text{MgSO}_4$  – 0,25, кукурузный экстракт – 2.

Показано, что *Ph. impudicus* 5 можно выращивать на средах, содержащих ржаную, пшеничную, соевую муку, молочную сыворотку, что открывает перспективу для разработки комплексных питательных сред.

Для роста биомассы *Ph. impudicus* 5 более благоприятным оказался слабощелочной исходный pH среды (4,0–5,0). В процессе роста гриба наблюдалось снижение pH до 3,5–3,7.

Оптимальная температура для глубинного культивирования *Ph. impudicus* 5 – 22–24 °С. При выращивании гриба при температуре выше 26 °С наблюдалось существенное замедление его роста.

Оптимизация состава питательной среды и условий культивирования позволила увеличить выход биомассы в 1,3 раза, содержание эндополисахаридов – в 1,5, экзополисахаридов – в 1,7 раза.

Проведено сравнительное изучение химического состава плодовых тел веселки и культивируемого мицелия *Ph. impudicus* 5 (см. таблицу). Содержание общих углеводов и эндополисахаридов было несколько выше в поверхностном мицелии. В клеточных стенках плодовых тел в большем количестве присутствовал хитин-глюкановый комплекс. При росте мицелия на жидких питательных средах в культуральной жидкости накапливались экзополисахариды, количество которых было в 1,5 раза выше при глубинном культивировании, чем при стационарном. По образованию полисахаридов гриб *Ph. impudicus* 5 не уступал известным лекарственным грибам *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* и *Cordyceps* sp. и др. [18]. Хотя более высокое количество сырого протеина определялось в плодовых телах, по содержанию истинного белка исследуемые образцы отличались незначительно. В мицелии количество липидов было больше в 1,4–1,6 раза.

**Химический состав плодовых тел и мицелия гриба *Ph. impudicus*, %**

| Показатель                 | Плодовое тело | Поверхностный мицелий | Глубинный мицелий |
|----------------------------|---------------|-----------------------|-------------------|
| Общие углеводы             | 50,8 ± 3,0    | 54,1 ± 3,3            | 50,6 ± 2,5        |
| Эндополисахариды           | 13,5 ± 0,6    | 14,6 ± 0,8            | 13,2 ± 0,4        |
| Экзополисахариды           | Нет           | 2,0 ± 0,5             | 4,0 ± 1,0         |
| Хитин-глюкановый комплекс  | 12,5 ± 0,5    | 7,0 ± 0,3             | 11,2 ± 0,6        |
| Сырой протеин              | 25,2 ± 0,4    | 20,0 ± 0,8            | 21,0 ± 0,6        |
| Белок истинный             | 13,5 ± 1,1    | 12,2 ± 0,3            | 13,4 ± 0,2        |
| Липиды                     | 1,4 ± 0,1     | 2,0 ± 0,1             | 2,3 ± 0,2         |
| Общие фенольные соединения | 0,64 ± 0,018  | 0,82 ± 0,014          | 0,46 ± 0,016      |

В настоящее время большее внимание уделяется поиску препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами. Высокий уровень антиоксидантной активности спиртовых экстрактов дегидроксирующих грибов во многом определяется содержанием в них общих фенольных соединений [19]. Показано, что данные вещества присутствуют в плодовых телах и мицелии *Ph. impudicus* (0,46–0,82 %). Более высокое их количество (до 0,82 %) содержалось в поверхностном мицелии.

**Закключение.** Таким образом, для получения биомассы и полисахаридов отобран штамм гриба *Ph. impudicus* 5. Проведено изучение его культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, подобран состав полусинтетической питательной среды и условия культивирования. Проведено сравнение химического состава мицелия и плодовых тел. Полученные результаты могут стать научной основой разработки технологии получения полисахаридсодержащей биомассы *Ph. impudicus*.

### Список использованной литературы

1. *Ананьева, Е. П.* Изучение условий культивирования и антиоксидантной активности мицелия базидиомицета *Phallus impudicus* (веселка обыкновенная) / Е. П. Ананьева, С. В. Гурина, Г. М. Алексеева // Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 80–82.
2. *Kuznecovs, S.* *Phallus impudicus*: from folk medicine to supportive cancer care / S. Kuznecovs, K. Jegina // Int. J. of Med. Mushrooms. – 2007. – Vol. 9, N 3–4. – P. 263–264.
3. Использование экстракта веселки обыкновенной в комплексной терапии онкозаболеваний в эксперименте / Е. М. Кандукова [и др.] // Сибир. онкол. журн. – 2010. – № 4 (40). – С. 25–29.
4. Высшие грибы в комплексной терапии злокачественных новообразований / С. Сушко [и др.] // Наука и инновации. – 2010. – № 8. – С. 35–39.
5. Исследование превентивного противовоспалительного потенциала *Phallus impudicus* при конкавалин А-индуцированном гепатите у крыс / П. П. Воронов [и др.] // Фундаментальные науки – медицине: материалы междунар. науч. конф., Минск, 17 мая 2013 г. – Минск, 2013. – Ч. 1. – С. 155–158.
6. Исследование репаративного действия веселки обыкновенной при ожогах III Б степени у крыс / П. П. Воронов [и др.] // Новости мед.-биол. наук. – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 116–121.
7. *Wasser, S. P.* Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S. P. Wasser // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 60. – P. 258–274.
8. *Бухало, А. С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.
9. *Molitoris, H. P.* Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi / H. P. Molitoris // Czech Mycol. – 2000. – Vol. 52, N 2. – P. 17–24.
10. *Stalpers, J. A.* Identification of wood-inhabiting Aphyllorphorales in pure culture / J. A. Stalpers // Stud. Mycol. – 1978. – N 16. – 248 p.
11. *Ермаков, А. И.* Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 256 с.
12. *Грушенко, М. М.* Лигноуглеводные комплексы древесины / М. М. Грушенко, Т. С. Аникиенко, В. М. Резников; под ред. В. Н. Сергеевой. – Рига: Зинатне, 1978. – 70 с.
13. *Tang, Y. J.* Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid / Y. J. Tang, J. J. Zhong // Enzyme and Microbial. Technol. – 2002. – Vol. 31, N 1–2. – P. 20–28.
14. Exopolysaccharides of some medicinal mushrooms: production and composition / V. G. Babitskaya [et al.] // Int. J. of Med. Mushrooms. – 2000. – Vol. 2. – P. 51–54.
15. *Петербургский, А. В.* Практикум по агрономической химии / А. В. Петербургский. – М.: Колос, 1968. – 496 с.
16. *Folch, I.* A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues / I. Folch, M. Lees, G. H. S. Sloan-Staulet // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 491–509.
17. *Запромётов, М. Н.* Фенольные соединения растений: биосинтез, превращение, функции / М. Н. Запромётов. – М.: Наука, 1985.
18. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре: сб. науч. тр. в 2 т. / Н. А. Бисько [и др.]; под ред. чл.-кор. НАН Украины С. П. Вассера. – Киев: Альтерпрес, 2012. – Т. 2. – 459 с.
19. *Бабицкая, В. Г.* Антиокислительная активность некоторых микро- и макромицетов-деструкторов лигноцеллюлозных субстратов / В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба, О. В. Осадчая // Прикл. биохим. и микробиол. – 1997. – Т. 33, № 5. – С. 559–563.

Поступила в редакцию 04.08.2015