

Погруженное культивирование штамма базидиомицета *Lentinus edodes* с широким спектром биологической активности

Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ¹, Н. Ю. КАЦ¹, А. И. УСОВ², А. В. БАРКОВ¹, В. А. ВИНОКУРОВ³

¹ ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» РАМН

² Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН

³ Российский государственный университет нефти и газа им. И. М. Губкина

Submerged Cultivation of *Lentinus edodes* Strain with Broad Spectrum Biological Activity

L. M. KRASNOPOLSKAYA, N. YU. KATS, A. I. USOV, A. V. BARKOV, V. A. VINOKUROV

G. F. Gause Research Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

I. M. Gubkin Russian State University of Petroleum and Gases, Moscow

Отобран штамм *Lentinus edodes*, способный к интенсивному образованию антибиотика лентинамицина В, метаболита эри-таденина, обладающего гиполипидемической активностью, и биологически активных водорастворимых эндополисахаридов. Оптимизирована питательная среда для погруженного культивирования отобранного штамма, что обеспечило сокращение длительности процесса культивирования и двукратное увеличение выходов биомассы гриба и эндополисахаридов до 21 г/л и 4,8 г/л культуральной жидкости соответственно. Суммарная фракция водорастворимых полисахаридов из мицелия отобранного штамма содержала в качестве нейтральных моносахаридов глюкозу, галактозу, маннозу, арабинозу и ксилозу, основным моносахаридом являлась глюкоза. Предложенный способ погруженного культивирования отобранного штамма позволяет получать несколько целевых веществ за один технологический процесс.

Ключевые слова: погруженное культивирование, *Lentinus edodes*, лентинамицин В.

A highly potent strain of *Lentinus edodes* producing lentinomycin B, an erythadenin metabolite showing hypolipidemic activity, and biologically active water soluble endopolysaccharides was isolated. The optimum composition of the medium for the strain submerged cultivation was developed. The medium provided shorter period of the strain cultivation and a 2-fold increase of the biomass yield and production of the endopolysaccharides up to 21 g/l and 4.8 g/l of the culture fluid respectively. The total fraction of the water soluble polysaccharides isolated from the mycelium contained glucose, galactose, mannose, arabinose and xylose as the neutral monosaccharides. Glucose was the main monosaccharide. The procedure of the strain submerged cultivation provided production of several final substances during a single technological cycle.

Key words: submerged cultivation, *Lentinus edodes*, lentinomycin B.

Введение

Съедобный культивируемый гриб *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (syn. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (шиитаке, сиитакэ, пилолистник съедобный) обладает широким спектром биологической активности. Его метаболиты, в число которых входят как низкомолекулярные соединения, так и биополимеры, способны проявлять иммуномодулирующие, противоопухолевые, гиполипидемические, гипогликемические, противовирусные, антибактериальные, антиоксидантные и др. свойства. Наиболее известен полисахарид клеточной стенки гриба — лентинан, представляющий собой β-D-глюкан и используемый в Япо-

нии для производства противоопухолевого лекарственного средства того же названия [1–8].

Ранее нами была изучена антибиотическая активность 15 штаммов *L. edodes* и выявлено восемь штаммов, высокоактивных в отношении использованных тест-организмов: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* и др. В качестве основного действующего вещества был идентифицирован антибиотик лентинамицин В, относящийся к группе алифатических спиртов с двойными и тройными связями. Кроме того, 4 из отобранных штаммов показали способность к синтезу эритаденина — метаболита с гиполипидемической активностью. За исключением одного штамма все отобранные культуры при погруженном культивировании выделяли действующие вещества в культуральную жидкость и не накапливали их в мицелии [1].

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Б.Пироговская, 11, строение 1. НИИНА РАМН

Повышение рентабельности и снижение экономических рисков биотехнологических производств может быть достигнуто в числе прочего за счёт увеличения числа целевых продуктов, получаемых за один технологический цикл. В нашем исследовании целесообразно было использовать для получения перспективных метаболитов не только культуральную жидкость *L.edodes*, но и мицелий гриба, способный содержать биологически активные полисахариды и их комплексы с белками.

В связи с этим цель настоящего исследования заключалась в отборе штамма *L.edodes*, сочетающего способность к синтезу лентинамицина В и эритаденина с высоким выходом эндополисахаридов, обладающих противоопухолевой активностью, и разработке питательной среды, обеспечивающей эффективность процесса погруженного культивирования.

Материал и методы

В ходе работы были исследованы 8 штаммов *L.edodes* (3, 4, 5, 7, 8, 12, 14 и 15) из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных веществ ФГБУ «НИИНА» РАМН. Хранение штаммов и их выращивание на плотных средах и в погруженной культуре осуществляли по [1].

Питательные среды для погруженного культивирования готовили, комбинируя два источника углерода (глюкоза 20 г/л, растительное масло 10 мл/л), и два источника азота (соевая мука 10 г/л и кукурузный экстракт 1 мл/л в сочетании с нитратом натрия 1 г/л). Среда содержала также минеральные источники фосфора, калия и магния.

Длительность процесса погруженного культивирования составляла от 4 до 11 суток. По его окончании мицелий отфильтровывали от культуральной жидкости, промывали дистиллированной водой и сушили при температуре 37°C до постоянного веса. Содержание влаги в воздушно-сухой мицелии культуры составляло 5–7%. В опытах определяли содержание воздушно-сухой биомассы весовым методом и рН фильтрата культуральной жидкости с помощью иономера универсального.

Для оптимизации состава среды для погруженного культивирования использовали два метода математического планирования: метод полного факторного эксперимента (ПФЭ) и метод крутого восхождения [9, 10]. Для обработки результатов применяли программу Statistica 6.0.

Для приготовления водного экстракта мицелия или плодовых тел навеску предварительно измельченного воздушно-сухого мицелия (3,6 г) экстрагировали 100 мл кипящей воды. Экстракцию проводили в автоклаве при режиме 1,2 атм. в течение 1 ч. Экстракт отделяли от мицелия фильтрованием. Суммарную полисахаридную фракцию водорастворимых полисахаридов погруженного мицелия *L.edodes* получали, добавляя в экстракт 4 объёма 96% этанола. Полученный осадок

отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. Затем осадок растворяли в небольшом количестве воды, раствор фильтровали и лиофилизировали.

Количественное определение водорастворимых полисахаридов водных экстрактов погруженного мицелия и мицелия плодовых тел проводили с использованием цветной реакции с фенолом и серной кислотой [11].

Состав моносахаридов определяли с помощью газожидкостной хроматографии на хроматографе «Agilent Technologies» модель 5790A («Hewlett Packard», США), предварительно проведя полный гидролиз навески суммарной фракции водорастворимых полисахаридов посредством их полного гидролиза 2 М трифторуксусной кислотой при 100°C в течение 8 ч.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы следовало отобрать штамм *L.edodes*, сочетающий высокую антибиотическую активность с интенсивной продукцией биомассы и эндополисахаридов. Отбор провели среди шести штаммов с высокой антибиотической активностью. Из дальнейшей работы был исключен штамм 14, накапливающий лентинамицин В в мицелии, что затрудняет работы по выделению и химической очистке целевых продуктов, и штамм 5, выход погруженной биомассы которого по предварительным результатам не превосходил 5 г/л культуральной жидкости (КЖ).

Для определения накопления воздушно-сухой биомассы и эндополисахаридов штаммами *L.edodes* провели их 7-дневное погруженное культивирование на базовой среде с глюкозой и соевой мукой. В таблице 1 приведены полученные результаты в пересчёте на абсолютно сухой вес мицелия. Наибольший выход биомассы был отмечен у штаммов 12, 7 и 3, водорастворимых эндополисахаридов — у штаммов 15, 12 и 4. Конечный рН фильтратов культуральной жидкости изученных штаммов на 7-е сутки составлял 3,25–3,45 при исходном рН среды 6,2.

Экспресс-определение длительности процесса погруженного культивирования показало, что у штаммов 3 и 12 она составляет 6 суток, у остальных — превышает это значение.

Для дальнейшей работы был выбран штамм 15, как активный продуцент лентинамицина А, эритаденина и эндополисахаридов.

Следующий этап работы был посвящен разработке жидкой питательной среды для погруженного культивирования отобранного штамма. Её начали с качественного подбора источников пи-

Таблица 1. Выход биомассы и эндополисахаридов при погруженном культивировании штаммов *L.edodes*

Штаммы	Накопление воздушно-сухой биомассы, г/л	Содержание водорастворимых полисахаридов в мицелии, %	Выход водорастворимых полисахаридов мицелия, г/л КЖ
3	13,7	4,4	0,60
4	11,4	6,1	0,70
7	14,7	4,4	0,65
8	9,8	4,4	0,43
12	15,1	5,0	0,75
15	10,7	8,1	0,87

Таблица 2. Содержание водорастворимых полисахаридов в погруженном мицелии *L.edodes* штамма 15 в зависимости от состава жидкой питательной среды

Показатель	Жидкие питательные среды			
	L 1 (глюкоза, соевая мука)	L 7 (растительное масло, соевая мука)	L 9 (растительное масло, кукурузный экстракт)	L 21 глюкоза, растительное масло, соевая мука
Выход водорастворимых эндополисахаридов, г/л КЖ	0,96	0,64	1,24	2,02

Таблица 3. Матрица планирования и результаты полного факторного эксперимента

и	X1 (растительное масло)	X2 соевая мука	X3 глюкоза	X4 KN_2PO_4	Y_i воздушно-сухая биомасса, г/л	Обозначение строк	Коэффициент регрессии, b_i
1	—	—	—	—	10,8	«1»	11,76
2	+	—	—	—	9,5	X1	0,13
3	—	+	—	—	12,5	X2	2,01
4	+	+	—	—	16,0	X1X2	0,56
5	—	—	+	—	10,9	X3	-0,06
6	+	—	+	—	9,1	X1X3	-0,14
7	—	+	+	—	13,6	X2X3	0,10
8	+	+	+	—	13,9	X1X2X3	-0,12
9	—	—	—	+	9,8	X4	-0,27
10	+	—	—	+	9,5	X1X4	0,04
11	—	+	—	+	13,1	X2X4	0,06
12	+	+	—	+	13,4	X1X2X4	-0,31
13	—	—	+	+	9,2	X3X4	0,10
14	+	—	+	+	9,2	X1X3X4	0,31
15	—	+	+	+	13,2	X2X3X4	0,19
16	+	+	+	+	14,6	X1X2X3X4	0,22

Примечание. Доверительный интервал $\varepsilon = 0,7$, уровень значимости 5%.

тания, изучая эффективность сред, различающихся сочетанием источников углерода и азота. Полученные результаты показали, что наибольшую продукцию эндополисахаридов штаммом *L.edodes* 15 обеспечивает среда L 21, содержащая в своем составе глюкозу (20 г/л), растительное масло (10 мл/л), соевую муку (10 г/л) и минеральные соли (табл. 2). Выход воздушно-сухой биомассы *L.edodes* штамма 15 при культивировании на данной среде в среднем составлял 8–12 г/л на 6–7-е сутки культивирования. Ранее было показано, что среда L 1 обеспечивала высокую антибиотическую активность отобранного штамма.

Далее была проведена оптимизация количественного состава ингредиентов среды L 21. Исследовали четыре фактора: глюкозу, растительное масло, соевую муку и дигидрофосфат калия. Средний уровень концентрации глюкозы составил 15 г/л, растительного масла — 13 мл/л, соевой муки 13 г/л, дигидрофосфата калия — 2,5 г/л. Единица варьирования концентрации глюкозы составила 5 г/л, растительного масла — 3 мл/л, соевой муки — 3 г/л, дигидрофосфата калия — 0,5 г/л. Длительность процесса культивирования составляла 6 сут. Критерием оценки (Y_i) служил выход воздушно-сухой биомассы.

На основании составленной матрицы планирования был проведен эксперимент, результаты которого представлены в табл. 3.

Полученные в ПФЭ результаты позволили рассчитать коэффициенты регрессии (b_i). Сопоставление их абсолютных значений с величиной доверительного интервала (ε) показало, что на образование биомассы статистически значимое влияние оказывает соевая мука, концентрация которой находилась в лимитирующей области.

Полученные в ПФЭ результаты были использованы для построения поверхностей отклика в трёхмерном пространстве, отражающей зависимость накопления биомассы от исследованных факторов.

Экстраполяция поверхности отклика, описывающей зависимость выхода биомассы от концентраций соевой муки и дигидрофосфата калия (рис. 1) позволила предположить, что положительное воздействие на выход биомассы при повышении концентрации соевой муки может оказать уменьшение концентрации дигидрофосфата калия. Поэтому в первом опыте по методу крутого восхождения одновременно увеличивали концентрацию соевой муки и снижали концентрацию дигидрофосфата калия по алгоритму, рассчитанному в соответствии с величиной коэффициентов регрессии. Длительность процесса культивирования составила 6 сут.

В первом опыте по методу крутого восхождения максимальное увеличение выхода абсолютно сухой биомассы в сравнении с исходной средой составило 64% ($18,0 \pm 0,2$ г/л КЖ).

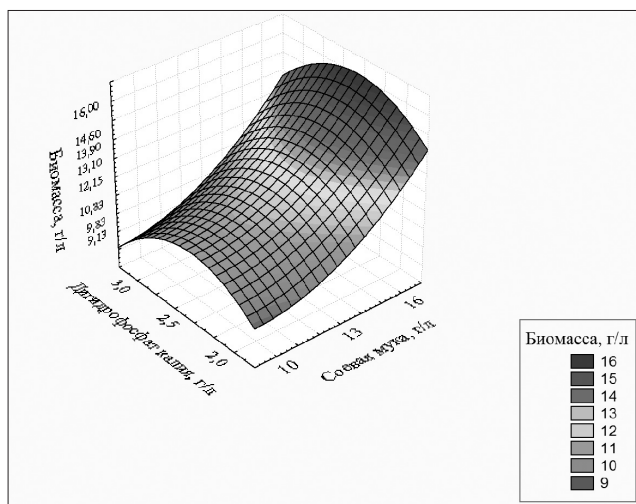


Рис. 1. Зависимость выхода биомассы *L.edodes* штамма 15 от концентраций соевой муки и дигидрофосфата калия. Поверхность отклика, построенная по результатам ПФЭ.

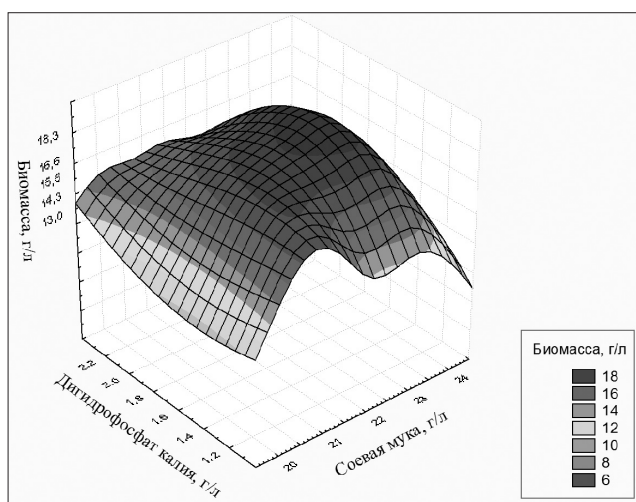


Рис. 2. Зависимость выхода биомассы *L.edodes* штамма 15 от концентраций соевой муки и дигидрофосфата калия. Поверхность отклика, построенная по результатам ПФЭ и опытов по методу крутого восхождения.

Дальнейшее увеличение содержания соевой муки было нецелесообразно, так как гриб был не способен её полностью утилизировать. Поэтому во втором опыте по методу крутого восхождения продолжили постепенное уменьшение концентрации дигидрофосфата калия без изменений содержания соевой муки. Наивысший показатель содержания абсолютно сухой биомассы составил $21,2 \pm 0,4$ г/л КЖ, что практически в два раза превышало выход биомассы на исходной среде. Выход эндополисахаридов на оптимизированной среде достигал 4,8 г/л КЖ.

Поверхность отклика, рассчитанная с использованием всего массива полученных результатов, представлена на рис. 2.

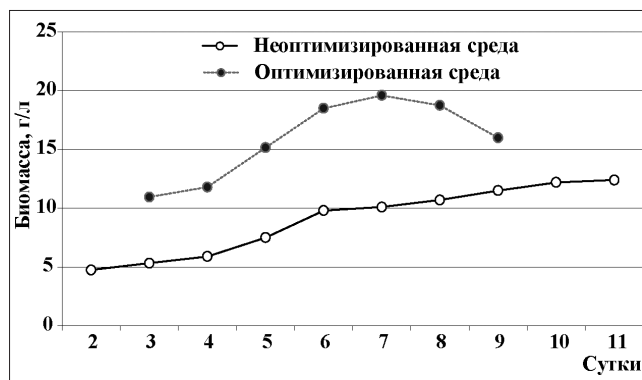


Рис. 3. Накопление воздушно-сухой биомассы *L.edodes* штамма 15 в процессе погруженного культивирования на оптимизированной среде и неоптимизированной.

Изучение длительности процесса погруженного культивирования *L.edodes* штамма 15 на оптимизированной и исходной среде показало (рис. 3), что наряду с двукратным увеличением выхода биомассы оптимизация привела также к существенному сокращению длительности процесса погруженного культивирования. Разработанная методом математического планирования среда обеспечивала стабильность периодического процесса культивирования отобранного штамма, что выражалось в стабильности выходов биомассы и содержания в ней эндополисахаридов, значения конечного pH культуральной жидкости и длительности процесса, а также в морфологической однородности погруженного мицелия, которая отсутствовала при использовании исходных сред.

Выделенная из погруженного мицелия *L.edodes* штамма 15, полученного при выращивании его на оптимизированной среде, суммарная фракция водорастворимых полисахаридов была охарактеризована по составу нейтральных моносахаридов. Полученные результаты показали, что основным моносахаридом была глюкоза (36,83%), ей существенно уступали по содержанию галактоза и манноза — 12,30 и 9,78% соответственно, в качестве минорных моносахаридов присутствовали арабиноза и ксилоза — 1,89 и 0,86% соответственно.

Погруженная культура *L.edodes* штамм 15, полученная на оптимизированной среде, была использована для подтверждения биологической активности. С этой целью выделенные из культурального фильтрата препараты-сырцы лентинамицина В и эритаденина, а также полученная суммарная фракция водорастворимых полисахаридов мицелия были переданы для проведения соответствующих испытаний. Методами тонкослойной хроматографии с последующим биоавтографическим проявлением на *B.subtilis* и *A.niger* было показано, что состав антибиотического комплекса и его активность остались без изменений. Суммар-

ная фракция водорастворимых эндополисахаридов проявила достоверную противоопухолевую активность в опыте *in vivo* на модели перевиваемого мышинового лимфолейкоза Р 388 [12, 13].

Выводы

1. Отобран штамм *L.edodes* с широким спектром биологической активности. *L.edodes* штамм 15 — активный продуцент антибиотика лентинамицина В, эритаденина, обладающего гиполипидемическими свойствами, и противоопухолевых водорастворимых эндополисахаридов. Лентинамицин В и эритаденин накапливаются в культуральной жидкости продуцента, полисахариды — в мицелии.

2. Использование отобранного штамма *L.edodes* позволяет получать несколько целевых продуктов за один технологический цикл, что способно повысить рентабельность биотехнологического производства.

3. Разработана жидкая питательная среда для погруженного культивирования отобранного штамма, обеспечивающая практически двукрат-

ное увеличение выхода его биомассы и водорастворимых эндополисахаридов по сравнению с исходной средой и существенное сокращение длительности процесса выращивания.

4. Суммарная фракция водорастворимых полисахаридов мицелия содержит в своем составе пять нейтральных моносахаридов: глюкозу, галактозу, маннозу, арабинозу и ксилозу, основным моносахаридом является глюкоза.

5. Выделенные из погруженной культуры *L.edodes* штамм 15, выращенной на оптимизированной среде, препараты лентинамицина, эритаденина, водорастворимых эндополисахаридов были переданы для испытаний, подтвердивших их биологическую активность.

Работа частично выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы» при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соболева Н.Ю., Краснопольская Л.М., Федорова Г.Б., Катруха Г.С. Антибиотические свойства штаммов базидиального гриба *Lentinus edodes*. Антибиотики и химиотер 2006; 51: 7: 3—8.
2. Ли Юй, Тулигуэл, Бао Хайин, Широких А.А., Широких И.Г., Егошина Т.Л., Кириллов Д.В. Лекарственные грибы в традиционной китайской медицине и современных биотехнологиях / Под общей ред. В.А. Сысуева). Киров: 2009; 320.
3. Kamiya T., Saitoh Y., Hashimoto M., Seki H. Hypocholesterolemic alkaloids of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. — I. Structure and synthesis of eritadenine. Tetrahedron 1972; 28: 899—906.
4. Ishikawa N.K., Kasuya M.C.M., Vanetti M.C.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. Brazil J Microbiol 2001; 32: 3: 206—210.
5. Hasegawa R., Kasuya M.C.M., Vanetti M.C.D. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. Microbiol Biotechnol 2005; 8: 2: 212—217.
6. Wu X.J., Hansen C. Antioxidant capacity, phenolic content, and polysaccharide content of *Lentinus edodes* grown in whey permeate-based submerged culture. J. Food Sci 2008; 73: 1: 1—8.
7. Wasser S. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Minireview. Appl. Microbiol. Biotech. 2011; 89: 5: 1323—1332.
8. Patel S., Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. J Biotech 2012; 2: 1—15.
9. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. М.: Из-во МГУ. 1980; 280.
10. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента. М.: Изд-во МГУ. 1969; 128.
11. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956; 28: 3: 350—356.
12. Леонтьева М.И., Барков А.В., Соболева Н.Ю., Исакова Е.Б., Автономова А.В., Бухман В.М., Винокуров В.А., Краснопольская Л.М. Погруженная биомасса *Agrocybe aegerita*, *Lentinus edodes*, *Laetiporus sulphures* с высоким содержанием эссенциальных жирных кислот и противоопухолевыми свойствами. Иммунопатология, аллергология, инфектология (Труды II Междисциплинарного микологического форума). М.: 2010; 1: 257.
13. Тренин А.С., Цвигул Е.А., Соболева Н.Ю., Автономова А.В., Краснопольская Л.М. Антимикробная и гиполипидемическая активность штаммов *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum*. Иммунопатология, аллергология, инфектология (Труды II Междисциплинарного микологического форума). М.: 2010; 1: 270.