

УДК 613.2:635.8:543.632.512

І.Р. Клечак, Н.А. Бісько, Н.Ю. Митропольська, Л.О. Антоненко

ВПЛИВ ЦИТРАТІВ БІОГЕННИХ МЕТАЛІВ, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ АКВАНАНОТЕХНОЛОГІЙ, НА РІСТ І БІОСИНТЕТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ЛІКАРСЬКОГО ГРИБА *TRAMETES VERSICOLOR*

We conduct the comparative study of the impact of biogenic metals citrates such as zinc, magnesium, iron obtained using nanotechnology, on growth of mycelium and biosynthetic activity of medicinal fungi *Trametes versicolor* at their cultivation in a liquid medium. To characterize the biosynthetic activity, we determine mass fraction of organic acids, exopolysaccharides concentration of phenol-sulfate method, the protein content by Lowry, cellulolytic activity in carboxymethylcellulose (CMC-activity) and filter paper (FP-activity). We select concentration of citrate biogenic metals (0,3 g/dm³), whose use contributed to a higher concentration of biomass *T. versicolor* by 2,5 times. We demonstrate that citrates of magnesium and zinc stimulated production of *T. versicolor* biomass, citrates of magnesium increased the protein content and CMC-activity, the iron citrate promoted the exopolysaccharides synthesis of *T. versicolor*. We determine the use of essential biometals nanocitrates in the nutrient medium positively effects biosynthetic properties of the medicinal mushroom *T. versicolor*. It reveals an opportunity to modify the macro- and microelement composition of mushroom mycelium in the future.

Вступ

Швидке просування в Україну транснаціональних компаній, що випускають дешеві та дуже популярні серед населення висококалорійні, але малопоживні харчові продукти, негативно впливає на забезпечення населення мікронутрієнтами. У більшості населення відзначається монотонізація раціону, втрата його різноманітності, зведення до вузького стандартного набору кількох основних груп продуктів і готових блюд, різке зменшення споживання свіжої рослинної їжі, яка відіграє провідну роль у забезпеченні раціону вітамінами та мінеральними речовинами. Ситуація погіршується ще й тому, що навіть у самій природній сировині вміст вітамінів і мінеральних речовин значно зменшується за умов використання в землеробстві та тваринництві інтенсивних технологій виробництва. Це призводить насамперед до розвитку дефіциту мікронутрієнтів: мінеральних речовин і вітамінів.

Сучасне промислове вирощування лікарських та їстівних грибів спрямоване на оптимізацію способів їх культивування для збільшення виходу біомаси й отримання грибної сировини з високою біологічною активністю, яку забезпечують у тому числі макро- і мікроелементи, особливо есенційні біометали [1–6].

Добре відома здатність вищих грибів накопичувати токсичні мінеральні елементи (Mg, Cd, As) [7]. У дослідженнях [8, 9] показано високий рівень біоаккумуляції плодовими тілами базидіальних, у т.ч. болетальних, грибів фізіологічно важливих для людини мінеральних

елементів Zn, Fe, Cu, Mn, Mo, Se, Ge, які в той же час є ключовими елементами у фізіології рослин і грибів.

Вирощування грибного міцелію на рідких поживних середовищах дає можливість змінювати та моделювати мінеральний склад культуральної рідини й отримувати грибний міцелій з оптимальним рівнем того чи іншого мікроелемента або комплексу мікроелементів.

Однак необхідно враховувати, що мінеральні речовини, які використовуються в поживних середовищах для вирощування грибів, мають бути чистими в хімічному відношенні і містити мінімум токсичних речовин, оскільки у грибів значно вищий ступінь поглинання токсичних елементів (Hg, Cd), ніж есенційних. Тому, крім хімічної чистоти, есенційні біометали повинні мати таку хімічну форму, яка б добре акумулювалась грибним міцелієм. До цього часу міцелій грибів вирощувався на культуральних середовищах з використанням неорганічних солей біометалів. Але відомо, що грибами найкраще засвоюються добре розчинні форми елементів та їх хелатні сполуки. Перспективними в цьому відношенні є комплекси біометалів з харчовими кислотами (карбоксилатами) і, зокрема, їх цитрати, які дозволені до застосування в харчовій промисловості [3, 8].

Проте традиційні хімічні технології отримання карбоксилатів харчових кислот трудомісткі, енерго- та матеріаловитратні, а отримані карбоксилати не вирізняються особливою хімічною чистотою.

Можливість отримання відносно дешевих і значно більш хімічно чистих карбоксилатів біо-

металів з'явилась як результат інтенсивного розвитку нанотехнологій. Так, за допомогою аква-нанотехнології отримано розчини цитратів, сукцинатів, лактатів і карбоксилатів практично всіх есенційних макро- і мікроелементів [10, 11].

Використання нанокарбоксилатів есенційних біометалів у живильних середовищах при вирощуванні їстівних і лікарських грибів відкриває реальну перспективу можливості модифікувати макро- та мікроелементний склад міцелію грибів.

Встановлено позитивну дію цитратів біогенних металів, отриманих методом аквананотехнологій, на урожайність деяких сільськогосподарських культур, приріст живої маси тварин [1]. У той же час не досліджена специфіка дії цитратів біогенних металів на життєдіяльність лікарських грибів у глибинній культурі.

Постановка задачі

Метою роботи є встановлення впливу цитратів цинку, магнію та заліза, отриманих методом аквананотехнологій, на накопичення біомаси та біосинтетичну активність лікарського гриба *Trametes versicolor* 353.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктами досліджень були види із колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України: *T. versicolor* (*C. versicolor* (L.: Fr.) Quel) 353, *T. ochracea* (*C. zonatus* (Fr.) Quel) 5302, *T. hirsuta* (*C. hirsutus* (Fr.) Quel) 5137, *T. villosa* (*C. villosus* (Fr.) M. Bond et S. Herrera) 1009.

Штами культивували на живильному середовищі такого складу (контроль), г/дм³: глюкоза – 25, пептон – 1, K₂HPO₄ – 1, KH₂PO₄ – 1, або MgSO₄·7H₂O – 0,5, або ZnSO₄·7H₂O – 0,3, або FeSO₄·7H₂O – 0,2, залежно від досліджуваних цитратів металів, вода дистильована – 1 дм³. У дослідних варіантах цитрати біогенних металів Mg, Zn, Fe вносили в поживне середовище замість солей MgSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O. Вихідні розчини цитратів біогенних металів містили (окремо), мг/дм³: Mg – 500, Zn – 300, Fe – 200. Цитрати біогенних металів були отримані методом аквананотехнологій [10].

Міцелій вирощували глибинним методом на качалці за температури 30 °С протягом 7 діб. Інокулюм отримували при вирощуванні міцелію дослідних штамів на чашках Петрі, потім

гомогенізували. Кількість інокулюму становила 5 % від об'єму живильного середовища. Біомасу фільтрували через капроновий фільтр і висушували до постійної маси за температури 60 °С. Наприкінці культивування визначали: рН, масову частку органічних кислот [12], рівень накопичення екзополісахаридів фенол-сірчанокислим методом [13], вміст білка методом Лоурі, целюлазну активність за карбоксиметилцелюлозою (КМЦ-активність) [14] і фільтрувальним папером (ФП-активність) [15].

Дослідження проводили в 5 повторностях. Статистичну обробку проводили відповідно до [16] та за допомогою комп'ютерних пакетів MO Excel і Stat Soft Statistika 6.0. У таблиці та на рисунках подані середні статистично достовірні дані при 95 %-ній імовірності.

Результати і їх обговорення

У попередніх наших дослідженнях за комплексом ознак (рівень накопичення біомаси та економічний коефіцієнт росту в глибинній культурі) було вибрано чотири штами: *T. versicolor* 353, *T. ochracea* 5302, *T. hirsuta* 5137, *T. villosa* 1009.

На першому етапі роботи було досліджено вплив двох концентрацій 0,3 мг/дм³ і 0,6 мг/дм³ цитрату цинку на ростові показники чотирьох штамів *T. versicolor* 353, *T. ochracea* 5302, *T. hirsuta* 5137, *T. villosa* 1009 (таблиця).

Аналіз даних таблиці показав, що введення до складу середовища культивування цитрату цинку найістотніше вплинуло на рівень накопичення біомаси двох штамів *T. versicolor* 353 і *T. hirsuta* 5137. Так, для *T. versicolor* 353 за концентрації цитрату цинку 0,3 мг/дм³ рівень накопичення біомаси підвищувався в 2,5 разу, а за концентрації 0,6 мг/дм³ – лише в 2 рази порівняно з контролем. Для *T. hirsuta* 5137 за концентрації цитрату цинку 0,3 і 0,6 мг/дм³ рівень накопичення біомаси збільшувався в 2 і 1,8 разу відповідно. Для *T. ochracea* 5302, на відміну від *T. versicolor* 353 і *T. hirsuta* 5137, вищий рівень накопичення біомаси був характерний на середовищі з сульфатом цинку. Для *T. villosa* 1009 форма введення в живильне середовище цинку, у вигляді цитрату чи сульфату, не впливала на рівень накопичення біомаси.

Порівнявши кількість залишкових редуруючих цукрів і рівень накопичення біомаси (див. таблицю) та порівнявши економічний коефіцієнт росту, ми дійшли висновку, що ефектив-

Таблиця. Вплив концентрації цитрату цинку на накопичення біомаси лікарських грибів роду *Trametes*

Вид, штам	Концентрація цитрату цинку				Контроль	
	0,3 мг/дм ³		0,6 мг/дм ³		Накопичення біомаси, г/дм ³	Вміст залишкових редуруючих цукрів, г/дм ³
	Накопичення біомаси, г/дм ³	Вміст залишкових редуруючих цукрів, г/дм ³	Накопичення біомаси, г/дм ³	Вміст залишкових редуруючих цукрів, г/дм ³		
<i>T. versicolor</i> 353	6,03 ± 0,24 30 %	4,5 ± 0,2	4,64 ± 0,15 27 %	7,9 ± 0,5	2,46 ± 0,13 11 %	1,5 ± 0,1
<i>T. ochracea</i> 5302	5,30 ± 0,15 21 %	1,3 ± 0,1	3,84 ± 0,10 16 %	1,6 ± 0,2	7,20 ± 0,24 29 %	0,4 ± 0
<i>T. hirsuta</i> 5137	6,16 ± 0,22 25 %	0,5 ± 0	5,38 ± 0,17 23 %	1,8 ± 0,2	2,90 ± 0,11 12 %	1,2 ± 0,1
<i>T. villosa</i> 1009	2,47 ± 0,11 11 %	1,8 ± 0,1	2,97 ± 0,10 12 %	0,4 ± 0	2,71 ± 0,12 11 %	0,5 ± 0

Примітка. Контроль – середовище із сульфатом цинку.

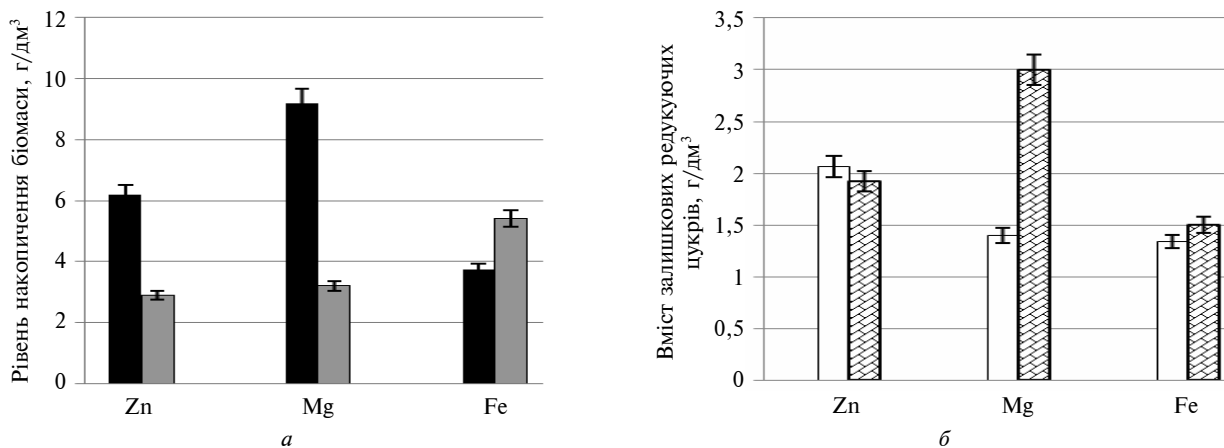


Рис. 1. Вплив цитратів цинку, магнію заліза й сульфатів цих металів на синтез біомаси та вміст залишкових редуруючих цукрів при глибинному культивуванні *T. versicolor* 353: а – рівень накопичення біомаси при застосуванні: ■ – цитрату металу, □ – сульфату металу; б – вміст залишкових редуруючих цукрів при застосуванні: □ – цитрату металу, ▨ – сульфату металу

ніше серед чотирьох штамів накопичував біомасу з меншою затратою джерела вуглецю *T. versicolor* 353 на середовищі з концентрацією цитрату цинку 0,3 мг/дм³ (див. таблицю).

Таким чином, для подальшої роботи вибрано за показником накопичення біомаси штам *T. versicolor* 353 та визначено, що концентрація цитрату цинку 0,3 мг/дм³ сприяє вищому рівню накопичення біомаси.

На другому етапі було досліджено вплив цитратів цинку, магнію, заліза в концентрації 0,3 мг/дм³ і сульфатів цих металів на ростові та біосинтетичні властивості *T. versicolor* 353.

Результати дослідження показали, що при культивуванні на живильних середовищах з цитратами біогенних металів магнію та цинку кіль-

кість біомаси *T. versicolor* 353 значно збільшувалась (в 3 рази) порівняно з культивуванням на середовищі з сульфатом магнію та цинку. При застосуванні цитрату магнію був відзначений найвищий рівень накопичення біомаси *T. versicolor* 353 – 9,2 г/дм³ (рис. 1).

Особливістю культивування *T. versicolor* 353 на середовищі з цитратом заліза було те, що в цих умовах було зареєстровано стимуляцію синтезу білка в біомасі порівняно із середовищем із сульфатом заліза.

При додаванні цитрату магнію спостерігалось збільшення білка в біомасі майже в 3 рази порівняно з додаванням сульфату магнію. Було встановлено, що цитрат цинку не впливав на процеси синтезу білка в біомасі *T. versicolor* 353.

Отримані результати свідчать про те, що додавання до живильного середовища цитратів магнію та заліза стимулює утворення екзополісахаридів *T. versicolor* 353 (рис. 2).

Було встановлено, що показники рН середовища практично не змінювались при додаванні цитратів або сульфатів усіх досліджених металів (рис. 3, а). У той же час вміст органічних кислот значною мірою коливався залежно від металу та його форми (сульфатної або цитратної). Так, інтенсивність синтезу органічних кислот *T. versicolor* 353 залежно від наявності в середовищі цинку, магнію або заліза збільшувалась. При цьому цитратна або сульфатна форма цинку не впливала на цей процес, тоді як сульфат магнію та цитрат заліза стимулювали синтез органічних кислот у середовищі (рис. 3, б).

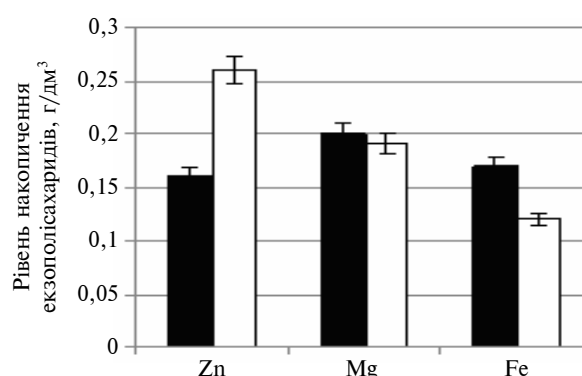


Рис. 2. Вплив цитратів цинку, магнію, заліза й сульфатів цих металів на синтез екзополісахаридів при глибокому культивуванні *T. versicolor* 353: ■ – рівень накопичення екзополісахаридів при застосуванні цитрату металу, □ – рівень накопичення екзополісахаридів при застосуванні сульфату металу

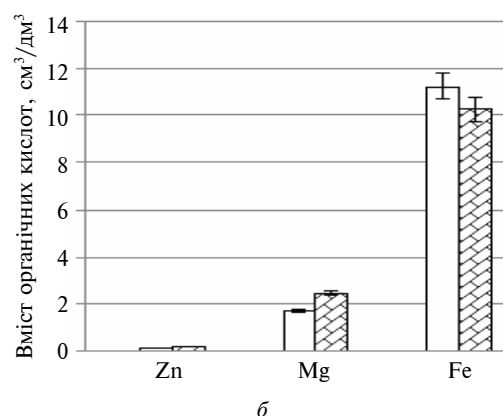
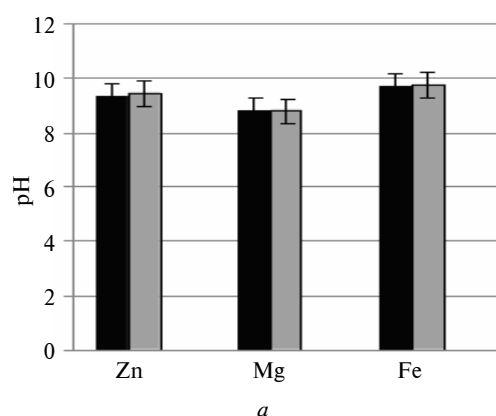


Рис. 3. Вплив цитратів цинку, магнію, заліза й сульфатів цих металів на зміну рН середовища при вирощуванні *T. versicolor* 353 та синтез органічних кислот цим штамом: а – величина рН при застосуванні: ■ – цитрату металу, □ – сульфату металу; б – вміст органічних кислот при застосуванні: □ – цитрату металу, ▨ – сульфату металу

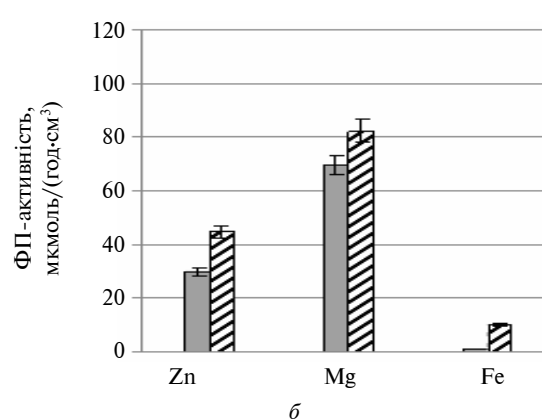
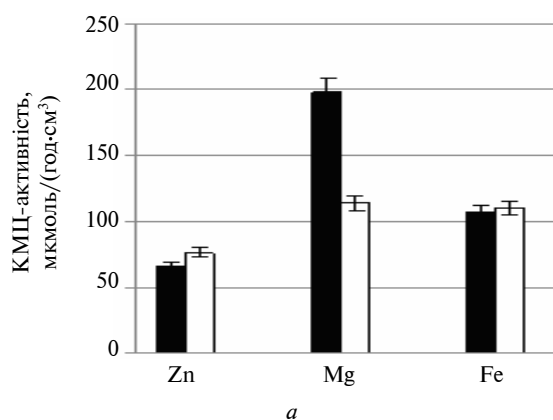


Рис. 4. Вплив цитратів цинку, магнію, заліза і сульфатів цих металів у складі середовища для глибокого культивування на величину целулазної активності *T. versicolor* 353 на різних модельних субстратах: а – КМЦ-активність при застосуванні: ■ – цитрату металу, □ – сульфату металу; б – ФП-активність при застосуванні: □ – цитрату металу, ▨ – сульфату металу

Було досліджено целюлазну активність *T. versicolor* 353 на різних модельних субстратах: карбоксиметилцелюлозі і фільтрувальному папері, на середовищах із цитратними або сульфатними формами цинку, магнію чи заліза (рис. 4).

Значне підвищення КМЦ-активності *T. versicolor* 353 – в 1,7 разу – було продемонстровано при додаванні у середовище цитрату магнію (рис. 4, а). ФП-активність була в 1,5 разу вищою при додаванні сульфатів цинку і магнію, ніж при застосуванні цитратів цих металів.

Таким чином, встановлена специфічна дія цитратів цинку, магнію та заліза на процеси накопичення біомаси, білка, екзополісахаридів і на біосинтетичну активність лікарського гриба *T.versicolor* 353 при глибинному культивуванні.

Висновки

Застосування наночастинок цитратів цинку, магнію і заліза спричиняло різний вплив на ростові (рівень накопичення біомаси) та біосинтетичні (рівень накопичення екзополісахаридів, вміст органічних кислот, величину рН середовища, целюлазну активність) показники *T. versicolor* 353.

Вибрано за показником накопичення біомаси штам *T. versicolor* 353 та визначено, що

концентрація цитрату цинку 0,3 мг/дм³ сприяла вищому рівню накопичення біомаси – 6,03 г/дм³.

Встановлено, що застосування у складі середовища цитратів цинку і магнію сприяло підвищенню рівня накопичення біомаси штаму *T. versicolor* 353 в 2,4 і 2,7 разу відповідно порівняно із застосуванням сульфатів цих металів.

Встановлено підвищення карбоксиметилцелюлазної активності *T. versicolor* 353 при додаванні у живильне середовище цитрату магнію – в 1,7 разу вище, ніж при застосуванні сульфату магнію.

Доведено, що цитрат магнію у живильному середовищі стимулював синтез білків у біомасі *T. versicolor* 353 – їх кількість збільшувалась у 3 рази порівняно із сульфатом магнію.

Встановлено, що порівняно із сульфатом заліза наявність цитрату заліза у складі середовища сприяла більшому – в 1,4 разу – накопиченню екзополісахаридів *T. versicolor* 353.

У подальших дослідженнях планується вивчити сорбцію наночастинок цитратів цинку, магнію, селену, заліза міцелієм *T. versicolor* 353. Таким чином, міцелій лікарського гриба *T. versicolor* 353, збагачений переліченими біогенними металами, може бути основою для створення функціональних харчових продуктів із поліпшеним вмістом мінеральних речовин.

1. *Наноматеріали* в біології. Основи нановетеринарії / В.Б. Борисевич, В.Г. Каплуненко, М.В. Косінов та ін. – К.: ВД “Авіцена”, 2010. – 416 с.
2. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation (2003)* [Online]. Available: http://whglibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf
3. *Сердюк А.М., Гуліч М.П.* Політика в галузі харчування населення – головний пріоритет держави // Довкілля та здоров'я. – 2003. – № 3. – С. 8–11.
4. *Спиричев В.Б., Шатнюк Л.Н., Позняковский В.М.* Обогащение пищевых продуктов витаминами и минеральными веществами. – Новосибирск: Наука и технология, 2004. – 547 с.
5. *Коденцова В.М., Вржесинская О.А.* Пищевые продукты, обогащенные витаминами и минеральными веществами: их роль в обеспечении организма микро-нутриентами // Вопросы питания. – 2008. – 77, № 4. – С. 16–25.
6. *Бисько Н.А., Джуренко Н.И., Паламарчук Е.П.* Диетические добавки серии “Мико” – новые функциональные продукты на основе лекарственных грибов // Клиническая иммунология. Алергология. Инфектология. – 2009. – № 2. – С. 163–164.
7. *Иванов А.И., Блинохватова А.Ф.* О роли базидиальных макромицетов в трансформации ультрамикрорезонансов в экосистемах. 1. Биосорбция селена // Микология и фитопатология. – 2003. – 37, вып. 1. – С. 70–75.
8. *Новинюк Л.В.* Цитраты – безопасные нутриенты // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2009. – № 3 – С. 70–71.
9. *Сравнительная оценка биодоступности органических и неорганических форм цинка in vivo* / М.А. Баяржаргал, И.С. Зилова, С.Н. Зорин и др. // Вопросы питания. – 2008. – 77, № 1. – С. 34–37.
10. *Спосіб отримання карбоксилатів харчових кислот з використанням нанотехнологій:* Пат. України № 39392, МПК С07С 51/41, С07F 5/00, С07F 15/00, В82В 3/00 / М.В. Косінов, В.Г. Каплуненко. – Опубл. 25.02.2009, Бюл. № 4/2009.
11. *Нанотехнології* мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи вирішення ліквідації дефіциту макро-

- та мікроелементів / А.М. Сердюк, М.П. Гуліч, В.Г. Каплуненко, М.В. Косинов // Журнал Академії медичних наук України. – 2010. – **16**, № 1. – С. 107–114.
12. *Методи технологічного і мікробіологічного контролю у виноробстві* / За ред. Г.Г. Валуйко. – М.: Харчова промисловість, 1980. – 144 с.
13. *Грушенко М.М.* Лигноуглеводные комплексы древесины. – Рига: Зинатне, 1978. – 110 с.
14. *Клесов А.А.* Ферментативный гидролиз целлюлозы. I. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников // Биоорганическая химия. – 1980. – **6**. – С. 1225–1242.
15. *T. Ghose et al.*, Measure of cellulose activity (substrate, assays, activities and recommendation). Preprint of IUPAC Comission on biotechnology, 1981, 26 p.
16. *Антомонов М.Ю.* Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. – К.: Авваллон, 2006. – 558 с.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
15 березня 2013 року