

Электрон. текстовые, граф. данные. – Минск: РУП «Бел НИЦ «Экология», 2014. – С. 194-220.

**MONITORING OF RESOURCEFORMING TYPES
OF BERRY PLANTS AND EDIBLE FUNGI
ON THE AREAS OF BELARUS IN 2011-2015**

Moiseyeva T.R., Bordok I.V., Makhovik I.V., Volkova N.V.

The main aspects of fructification and monitoring of the resourceforming species of berry plants and edible fungi in the forest of Belarus for 2011-2015 are stated. Data on productivity of berry fields and fungi grounds on all areas of the country are provided.

Статья поступила в редколлегию 21.04.2016 г.



УДК 630*28:582.28

**БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ
GANODERMA LIPSIENSE (BATSCH) G. F. ATK. И ВЛИЯНИЕ
ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ВЕГЕТАТИВНЫЙ РОСТ
И ПЛОДООБРАЗОВАНИЕ ТРУТОВИКА ПЛОСКОГО**

Трухоновец В.В.¹, Поединок Н.Л.², Щерба В.В.³

¹*Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины
(г. Гомель, Беларусь)*

²*Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины
(г. Киев, Украина)*

³*Институт микробиологии НАН Беларуси
(г. Минск, Беларусь)*

Показано, что в карпофорах Ganoderma lipsiense (Batsch) G. F. Atk. содержится комплекс физиологически активных соединений: белки, липиды, меланины, полисахариды. В липидах плодовых тел трутовика плоского преобладают олеиновая (48,10%) и линолевая (45,84%) органические кислоты. Сумма ненасыщенных жирных кислот составила 95,81%, коэффициент ненасыщенности 1,41. Приведены особенности формирования плодовых тел G. lipsiense в искусственных условиях. Выявлено стимулирующее влияние на процессы образования плодовых тел G. lipsiense при использовании облучения культуры гриба лазерным светом длиной волны 632,8 нм.

ВВЕДЕНИЕ

В грибах открыт спектр новых природных соединений и специфических ферментов, которые пополнили ассортимент биологически активных ве-

ществ. Поэтому одной из актуальных задач, стоящих перед микробиологической, биотехнологической и фармацевтической отраслями промышленности является поиск новых видов и штаммов грибов для создания лечебных, лечебно-профилактических препаратов и биологически активных пищевых добавок. Базидиальные грибы способны синтезировать широкий комплекс веществ белковой, липидной природы, пигменты, витамины и другие физиологически активные соединения (ФАС). Кроме того, в базидиальных грибах содержатся полисахариды, хитин-глюкановый комплекс. Наличие этих и других веществ обеспечивает высокие сорбционные, онкостатические, иммунокорректирующие и другие свойства грибов [1]. Перспективными продуцентами веществ медико-биологического назначения являются трутовые грибы, в том числе трутовик плоский (*Ganoderma lipsiense* (Batsch) G.F. Atk.). Применение облучения низкоинтенсивным светом культивируемых макромицетов с помощью лазера на стадиях прорастания спор и роста вегетативного мицелия позволяет разработать новые методы получения высокоактивного посевного материала базидиомицетов. В частности, споры трутовика плоского не проявляют чувствительности к синему свету (488,0 нм) и полученный из них мицелий не отличался своей активностью от контроля. В то же время облучение как красным (632,8 нм), так и синим светом на всех указанных фазах развития вида, приводит к значительному повышению активности посевного мицелия. Новые подходы, позволяющие целенаправленно регулировать биологическую активность макромицетов, открывают большие перспективы для модификации существующих технологий культивирования высших базидиальных грибов и интенсификации технологических этапов получения биомассы и нутрицевтиков, что позволит повысить экономическую эффективность биотехнологического процесса [2]. Поэтому целью наших исследований являлось изучение биохимического состава плодовых тел и оценка влияния лазерного облучения на вегетативный рост и плодообразование гриба в условиях искусственной культуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения биохимического анализа использовались плодовые тела *G. lipsiense*, собранные в природе. Белок в плодовых телах определяли по Лоури [3]. Липиды экстрагировали методом Фолча [4], жирнокислотный состав липидов анализировали в виде метиловых эфиров жирных кислот на газожидкостном хроматографе «Chrom-5» (Чехия). Идентификацию жирных кислот проводили по относительным удерживаемым объемам, а также в сопоставлении с показателями метиловых эфиров чистых жирных кислот [5, 6]. Для получения экстрактов плодовые тела тонко измельчали, многократно замораживали жидким азотом и исчерпывающе экстрагировали 70⁰ этиловым спиртом в течение 30 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником до отрицательной пробы на содержание фенольных соединений. Полученный экстракт центрифугировали при 8000 об/мин (15 мин). Сумму моно- и полифенолов определяли с реактивом Фолина-Дениса [7].

Экстракцию меланиновых пигментов проводили 2%-ным раствором NaOH с коэффициентом разбавления 1:10 в течение 2-х часов на кипящей водяной бане. Полученный экстракт охлаждали, подкисляли до pH 2,0 концентрированной HCl и коагулировавший пигмент отделяли центрифугированием при 6000g в течение 15 мин. Полученный осадок растворяли в 2%-ном растворе NaOH и использовали для определения выхода меланина, количество которого рассчитывали по калибровочной кривой на основании данных фотометрирования раствора при длине волны проходящего света 490 нм. Содержание меланина в среде культивирования определяли прямым фотометрированием культуральной жидкости после отделения мицелия грибов [8]. Меланиновые пигменты идентифицировали при помощи качественных реакций с $KMnO_4$, H_2O_2 , $FeCl_3$ [9, 10]. Функциональные группы и элементный состав определяли по [11].

Определение полисахаридов проводили в соответствии с [12]. При этом для извлечения полисахаридов плодовые тела разрушали растиранием в ступке при глубоком замораживании с помощью жидкого азота. Разрушенные плодовые тела и мицелий заливали дистиллированной водой в соотношении 1:10 и кипятили на водяной бане в течение 15 мин. Удаление цитоплазматического содержимого осуществляли многократным суспендированием разрушенных плодовых тел в дистиллированной воде с центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин.

Процедуру отмывания прекращали лишь тогда, когда оптическая плотность супернатанта при 280 нм не превышала 0,1. Полученные экстракты концентрировали в 2-3 раза на роторном испарителе и обрабатывали 96⁰ этиловым спиртом в соотношении 1:1 по объему. Выпавший осадок (полисахарид) отделяли центрифугированием, затем его диализовали против дистиллированной воды в течение 2-х суток. Диализованный полисахарид осаждали этиловым спиртом в соотношении 1:2, промывали этанолом, эфиром, ацетоном и сушили при 37 °C.

Для исследования влияния лазерного излучения на рост и плодоношение базидиальных грибов в культуре, в рамках проведения совместных научных исследований проекта Б11УКР-26 «Разработать эффективные биотехнологии культивирования новых ценных видов съедобных и лекарственных грибов для введения в промышленное грибоводство Беларуси и Украины», были подвергнуты низкоинтенсивному лазерному облучению культуры *G. lipsiense*. Двухсуточный вегетативный мицелий гриба облучали низкоинтенсивным лазерным светом на сусло-агаровой среде в красной ($\lambda_1=632,8$ нм) и синей области спектра ($\lambda_2=488,0$ нм). Для оценки вегетативного роста облученных грибов культуры трутовика плоского были высеяны 0,5-литровые банки со стерильным вареным зерном (овес), повторность 5-кратная. Выросший посевной мицелий использовали для получения плодовых тел гриба. В качестве субстрата использовали осиновые и дубовые опилки, смешанные с пшеничными отрубями в процентном соотношении 80:20. Компоненты субстрата тщательно перемешивали и увлажняли водой до 60-65%. Субстрат фасовали в пакеты из полиэтилена низкого давления по 700 г и

стерилизовали в автоклавах при давлении 0,12 мПа, температуре 120-121 °С в течение 2 часов. В стерильных условиях субстраты инокулировали зерновым посевным мицелием *G. lipsiense* в количестве 2,5% от массы субстрата и термостатировали в темноте при температуре 24 °С. Для получения карпфоров гриба через 1 месяц температуру воздуха понижали до 15-16 °С. Влажность воздуха поддерживали на уровне 90-95%, свет – интенсивностью 50-100 лк, воздухообмен – 1-2-кратный в сутки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из первых этапов успешной интродукции новых видов лекарственных базидиальных грибов в промышленную культуру является изучение биохимического состава и влияния экологических факторов на рост и плодоношение в искусственных системах.

Биохимический состав плодовых тел трутовика плоского. Изучение биохимического состава показало, что в плодовых телах *G. lipsiense* содержится значительное количество общего белка и полисахаридов (таблица 1).

Таблица 1 – Биохимический состав плодовых тел *G. lipsiense*

Показатели	Единица измерения	Содержание
Белок общий	%	16,7
Белок истинный	%	11,5
Липиды	%	4,4
Фенольные соединения	мг%	1550
Меланин	%	5,5
Полисахариды	%	12,2

Из таблицы 1 видно, что трутовик плоский отличается также высоким содержанием липидов (4,4%), фенольных соединений (1550 мг%) и меланина (5,5%).

Особую роль в ряде жизненно важных процессов (передача информации, секреция метаболитов) играют липиды. Исследование жирнокислотного состава общих липидов, выделенных из плодовых тел трутовика плоского, выявило значительное преобладание олеиновой (48,10%) и линолевой (45,84%) органических кислот и достаточно высокую степень ненасыщенности липидов (1,41) (таблица 2). В составе жирных кислот обнаружены также пальмитиновая (3,62%) и пальмитолеиновая (1,87%) органические кислоты. Сумма насыщенных жирных кислот составила 4,19%, сумма ненасыщенных – 95,81%. Отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот в плодовых телах *G. lipsiense* составляет 22,86.

Таблица 2 – Жирно-кислотный состав липидов плодовых тел *G. lipsiense*

Кислота	Содержание, %
C _{14:0}	0,16
C _{15:0}	0,41
C _{16:0}	3,62
C _{16:1}	1,87
C _{17:0}	-
C _{18:0}	сл.
C _{18:1}	48,10
C _{18:2}	45,84
C _{18:3}	-
Сумма ненасыщенных жирных кислот (Σ_1)	95,81
Сумма насыщенных жирных кислот (Σ_2)	4,19
Отношение Σ_1 / Σ_2	22,86
К ненасыщенности	1,41

Влияние лазерного облучения на вегетативный рост и плодообразование трутовика плоского в искусственной культуре. Свет является одним из важнейших факторов для живых организмов на Земле. В биологии, медицине, биотехнологии широко используют низкоинтенсивное лазерное излучение для стимуляции различных биологических процессов. Ранее было отмечено позитивное влияние облучения посевного мицелия на увеличение выхода плодовых тел *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный), *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*. Выявлен положительный эффект облучения на накопление биомассы и полисахаридов некоторых видов грибов после световых обработок инокулюма [1, 2]. Анализируя результаты, можно допустить, что облучение низкоинтенсивным лазерным светом приводит к перестройке метаболизма клеток гриба и выступает его регулятором. Известно, что скорость прохождения клеточного цикла зависит от многих факторов (ионный состав питательной среды, присутствие гормонов, факторов роста и пр.). Возможно, что монохроматический свет, к которому грибы не адаптированы (в отличие от солнечного света, к которому организмы адаптированы в процессе эволюции), выступает как фактор окружающей среды, способный влиять на активность грибной клетки.

Полученные нами результаты также показали, что лазерное облучение несколько активизировало процессы вегетативного роста *G. lipsiense*. В частности, при использовании лазерного облучения для *G. lipsiense* наблюдается несколько большая плотность мицелия на субстрате по сравнению с контролем.

Из рисунка 1 видно, что при использовании длины волны 632,8 нм скорость вегетативного роста трутовика плоского на растительных субстратах по сравнению с контролем увеличивается. Однако в целом изменения в скорости мицелиального роста в рамках вида незначительны и полное обрастание зерновых и опилочных субстратных блоков завершилось во всех вариантах практически одновременно.

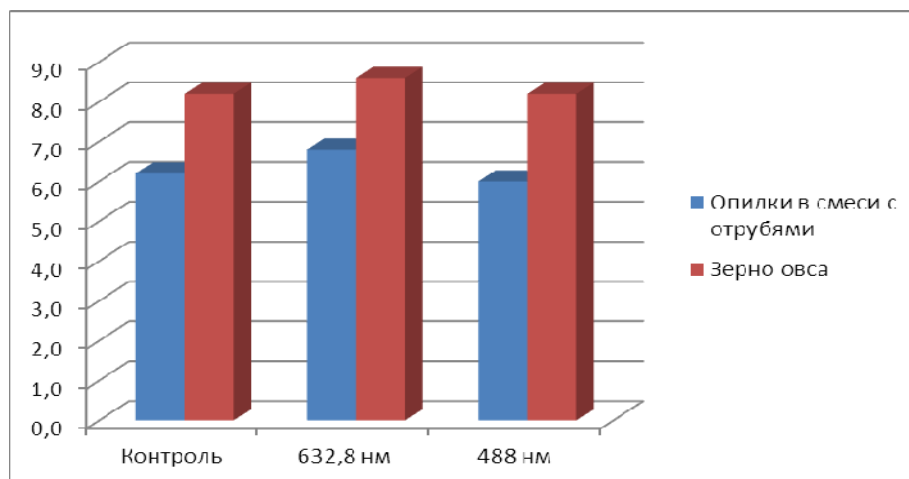


Рисунок 1 – Влияние лазерного облучения на среднесуточную скорость вегетативного роста *G. lipsiense* на растительных субстратах, мм

Плодообразование *G. lipsiense* было отмечено на зерновом субстрате через два месяца после инокуляции. На всех вариантах образовались белые уплотнения характерной формы, которые впоследствии начали окрашиваться в кремовый цвет. Однако дальнейшее развитие плодовых тел не происходило. При использовании субстрата из лиственных опилок в смеси с отрубями в соотношении 4:1, наиболее раннее плодообразование отмечено на варианте осиновыми опилками с длиной волны 632,8 нм – через 40-45 суток после инокуляции. На 3-10 суток позже появились примордии гриба на контрольном варианте и с обработкой мицелия длиной волны 488 нм (рисунок 2).



А



Б

Рисунок 2 – Образование примордий *G. lipsiense* на субстрате из осиновых опилок в смеси с отрубями 4:1: А- длина волны 632,8 нм, Б – контроль

Образование примордий на субстрате из дубовых опилок в смеси с отрубями 4:1 выявлено через 55-65 суток на варианте с обработкой мицелия длиной волны 632,8 нм, затем, на 3-8 суток позже на контрольном варианте и с длиной волны 488 нм (рисунок 3).



А



Б

Рисунок 3 – Плодношение *G. lipsiense* на субстрате из осиновых опилок в смеси с отрубями 4:1: А – длина волны 632,8 нм, Б – длина волны 488 нм и контроль

Развитие плодовых тел трутовика плоского происходило очень медленно, в течение трех месяцев. При этом формировались нормально развитые плодовые тела, сидячие, без ножек, прикрепленные боковой поверхностью к субстрату. Шляпки пробковатые, деревянисто-пробковые, плоские или копытообразные, половинчатые, от 2 до 10 см в поперечнике, сверху с неровными наплывами в виде концентрических бороздок, покрыты матовой коркой. Ткань плодового тела бурая, коричневая. Цвет шляпки сверху серовато-шоколадный. В молодом возрасте наружная (растущая) кромка карпофоров туповатая, имеет белый или беловатый цвет, с возрастом буреет и становится более заостренной. Гименофор трубчатый, белый, с возрастом кремово-белый, при надавливании темнеет. Трубочки округлые, очень мелкие, 0,1-0,2 мм в диаметре. Максимальная масса одного карпофора в эксперименте составила 27,0 г. Урожай плодовых тел грибов с одного субстратного блока составил в среднем 22,9 г, или 3,2% от массы субстрата. Следует отметить, что наряду с нормально развитыми карпофорами *G. lipsiense* отмечалось также образование бесформенных, резупинантных плодовых тел в виде темно-бурых коркообразных желваков, без гименофора. Наибольшее количество таких образований отмечено в первую очередь на контрольном варианте, во вторую в варианте с длиной волны 488 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований выявлено, что в плодовых телах трутовика плоского содержится комплекс ФАС: белки, липиды, меланины, полисахариды. В липидах плодовых тел *G. lipsiense* преобладают олеиновая (48,10%) и линолевая (45,84%) органические кислоты. Сумма ненасыщенных жирных кислот составила 95,81%, Отношение 22,86%, коэффициент ненасыщенности 1,41.

Показаны особенности образования плодовых тел *G. lipsiense* в искусственных условиях. При использовании пересевов облученного лазерным светом маточного мицелия на зерновой субстрат и дальнейшем использовании полученного зернового мицелия для производства плодовых тел *G. lipsiense* более раннее плодообразование происходит при применении облучения с длиной волны 632,8 нм.

Можно также предварительно предположить, что с каждым пересевом и увеличением возраста однократно облученного лазерным светом мицелия положительные эффекты будут постепенно снижаться в связи с постепенным переходом грибного организма из возбужденного состояния в стабильное. По нашему мнению, наиболее эффективно на сроки плодоношения и урожайность исследуемых грибов будет оказывать использование лазерного облучения непосредственно посевного мицелия перед инокуляцией субстрата, а также обросших мицелием *G. lipsiense* субстратных блоков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 1 / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – К.: Альтерпрес, 2011. – 212 с.
2. Поединок, Н.Л. Влияние на ростовую активность посевного материала культивируемых макромицетов низкоинтенсивного лазерного излучения / Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, В.М. Ходаковский, И.А. Дудка // Мікробіологія і біотехнологія – 2015. – Т. 29, № 1. – С. 77-86.
3. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.M. Lowry, N.J. Kosenbrough, A.L.Farr, R.J.Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – № 193. – P. 265-275.
4. 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.
5. Верещагин, А.Г. Состав триглицеридов масла хлопчатника / А.Г. Верещагин, С.В. Скворцов, Н.И. Исхаков // Биохимия. – 1963. – Т. 28, № 5. – С. 868-878.
6. Кейтс, М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
7. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения растений: биосинтез, превращение, функции / М.Н. Запрометов // Новые направления в физиологии растений. – М.: Наука, 1985. – С. 143-162.
8. Меланиновые пигменты некоторых базидиомицетов / В.В. Щерба, В.В. Сенчук, В.П. Курченко и др. // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1999. – № 2. – С. 49-53.
9. Лях, С.П. Микробный меланиногенез и его функции. – М.: Наука, 1981. – 273 с.
10. Елинов, Н.П. Меланиновый пигмент *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* Amaud (De Bary), 1910 / Н.П. Елинов, Н.А. Юрлова // Науч. докл. ВШ. Биол. науки. – 1976. – № 7. – С. 108-112.

9. Закис, Г.Ф. Функциональный анализ лигнинов и их производных / Г.Ф. Закис. – Рига: Зинатне, 1987. – 230 с.

10. Хорлин, А.Я. Методы исследования углеводов. – М.: Мир, 1975. – С. 9-13.

**THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF FRUITING BODIES GANODERMA
LIPSIENSE(BATSCH) G. F. ATK. AND THE INFLUENCE
OF LASER IRRADIATION ON VEGETATIVE GROWING AND THE FRUIT
FORMATION OF THE FLAT POLYPORE**

Truhonovets V.V., Poyedinok N.L., Scherba V.V.

It was shown that there is a complex of physiological active compounds – proteins, lipids, melanins, polysaccharides in Ganoderma lipsiense (Batsch) G.F. Atk. The oleic (48,10%) and linoleic (45,84%) organic acids preponderate in lipids of fruiting bodies of the flat Polypore. The amount of the desaturated oily acids constituted 95,81%, coefficient of unsaturation 1,41. There are peculiarities of forming fruit bodies G. lipsiense in artificial conditions. It was revealed a stimulating effect on the formation of fruiting bodies of G. lipsiense at using irradiation a mushroom culture at laser light (length wave was 632,8 nm.).

Статья поступила в редколлегию 21.04.2016 г.

