

УДК 582.284:543.061

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ И КУЛЬТИВИРУЕМОГО МИЦЕЛИЯ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА DAEDALEOPSIS TRICOLOR

Проценко М.А., Трошкова Г.П., Косогова Т.А., Теплякова Т.В.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
Кольцово, e-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

В чистую культуру из плодовых тел выделены три штамма гриба *Daedaleopsis tricolor*. Получены водные и этанольные экстракты из плодового тела и культивированного мицелия гриба *Daedaleopsis tricolor*. Экстракты охарактеризованы по основным группам биологически активных веществ: полисахариды, белки, тритерпены, каротиноиды, фенольные соединения, флавоноиды. Отмечено, что выход экстрактивных веществ из мицелия в 3–5 раз выше, чем из плодового тела, при этом содержание некоторых групп БАВ в экстрактах из плодовых тел гриба, в 2–4 раза выше, чем в экстрактах из мицелия. Проведено сравнение экстрактов, полученных из плодовых тел и культивируемого мицелия по биохимическому составу и биологической активности. Установлено, что экстракты гриба *Daedaleopsis tricolor* обладают антиоксидантной и противоопухолевой активностью, при этом экстракты из культивируемого мицелия показывают в большинстве случаев более высокую биологическую активность.

Ключевые слова: *Daedaleopsis tricolor*, плодовое тело, штамм, культивированный мицелий, сухой экстракт, биологически активные вещества

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FRUITING BODIES AND MYCELIUM OF THE BASIDIOMYCETE DAEDALEOPSIS TRICOLOR

Protsenko M.A., Troshkova G.P., Kosogova T.A., Teplyakova T.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector,
Koltsovo, e-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Three strains of the fungus *Daedaleopsis tricolor* have been created. Aqueous and ethanolic extracts of the fruiting bodies and mycelia of the fungus *Daedaleopsis tricolor* have been obtained. The extracts were characterized according to the main groups of biologically active substances, such as polysaccharides, proteins, triterpenes, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids. It was revealed that the yield of extractive substances from the mycelium is 3–5 times higher than that of the fruiting bodies, while the content of some groups of biologically active substances in extracts from fruiting bodies of the fungus, are 2–4 times higher than in extracts from the mycelium. Comparison of extracts from the fruiting bodies and mycelia according to biochemical composition and biological activity has been conducted. Extracts of the *Daedaleopsis tricolor* possess antioxidant and anticancer activity. It should be noted that extracts from mycelium have in generally a higher biological activity.

Keywords: *Daedaleopsis tricolor*, fruit body, strain, mycelium, dry extract, biologically active substances

Поиск новых источников биологически активных соединений с целью получения эффективных и безопасных препаратов является одной из важнейших задач современной биотехнологии. Известно, что высшие базидиомицеты содержат обширный спектр различных биологически активных соединений, таких как полисахариды, белки, фенольные соединения, тритерпены, меланины, каротиноиды, обладающих различными биологическими активностями. Сложность и многообразие химического состава базидиомицетов обуславливает их широкий спектр действия на организм. Получение эффективных и продуктивных штаммов в чистой культуре дает возможность использовать достижения в области биотехнологии для получения биомассы мицелия гриба в промышленных условиях. Выделение биологически активных соединений из культивируемого мицелия гриба имеет преимущество, т.к. качество сырья и выход биологически активных веществ становится контролируемым. Биотехноло-

гические приемы, такие как оптимизация состава питательной среды, условий культивирования, фазы окончания культивирования и т.д., позволяют получать набор БАВ в заданном соотношении.

Ксилотрофный базидиомицет *Daedaleopsis tricolor* (дедалеопсис трехцветный) является сравнительно малоизученным объектом. Все же известно, что тритерпены, выделенные из этого гриба, обладают антибактериальной и антиоксидантной активностью [10]. При этом водный экстракт из плодового тела *Daedaleopsis tricolor* проявляют противоопухолевую активность [9].

В связи с этим исследование данного базидиального гриба из местообитаний Западной Сибири, а также полученных из него экстрактов является актуальной задачей.

Целью работы было выделение в чистую культуру гриба *Daedaleopsis tricolor*, получение экстрактов из плодового тела и мицелиальной массы гриба, исследование содержания основных групп БАВ и биологической активности полученных экстрактов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали высушенные плодовые тела грибов, собранные в лесах близ села Вьюны в Колыванском районе Новосибирской обл. с погибшей березы *Betula pendula*, а также в окрестностях р.п. Кольцово в Новосибирском районе с березы *Betula pendula* и ивы *Salix alba*, а также биомассу мицелия, полученную в культуре на основе штаммов *Daedaleopsis tricolor*, выделенных нами из плодовых тел.

Выделение в культуру гриба проводилось преимущественно из тканей плодового тела. Кусочки плодового тела помещали на агаризованную питательную среду в чашки Петри. Через 6–8 суток на питательной среде наблюдался молодой растущий мицелий. Далее культуру очищали от микромицетов с помощью серии пересевов на чашки с агаризованной средой. Использовали две питательные среды: овсяной отвар агаризованный и обогащенную среду на основе мелассы и кукурузного экстракта [3].

Для суспензионного и поверхностного культивирования использовали глюкозо-пептонную среду (ГПС) следующего состава (г/л): глюкоза – 30,0 г; пептон – 5,0 г; дрожжевой экстракт – 2,0 г; KH_2PO_4 – 1,0 г; MgSO_4 – 0,5 г. [3]. Процесс глубинного культивирования проводили в колбах вместимостью 500 мл в 100 мл ГПС на круговых качалках при скорости вращения 190 об/мин, температуре $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 5–7 суток, используя в качестве посевного материала 2–3-х суточный инокулят глубинной культуры, выращенный на той же среде, в количестве 20% по объёму. Поверхностное культивирование на жидкой питательной среде проводили при комнатной температуре в таких же стеклянных флаконах, находящихся в горизонтальном положении, в течение 27 суток в темном месте и 6 суток – при рассеянном свете (общее время культивирования – 33 суток). Полученную методами поверхностного и глубинного культивирования биомассу отделяли, отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой, высушивали при температуре 60°C и измельчали в фарфоровой ступке.

Из сухого измельченного плодового тела и сухой биомассы культивированного гриба получали водные и этанольные экстракты. Для получения сухих этанольных экстрактов использовали метод четырехкратной дробной мацерации 70%-ым этанолом при температуре 60°C и соотношении сырья к экстрагенту 1:50, при общем времени экстракции 4 часа. При получении сухих водных экстрактов сырье с водой нагревали при $95\text{--}100^\circ\text{C}$ в колбе с обратным холодильником в течение 1 часа, отделяли экстракт, и процедуру повторяли. Соотношение сырья к экстрагенту составило 1:50. Охлажденные экстракты фильтровали, упаривали и высушивали при температуре 60°C .

Качественный анализ каротиноидов, флавоноидов и тритерпенов проводили методом ТСХ. Содержание белка в образцах определяли методом Бредфорд, полисахариды анализировали методом Дрейвуда в модификации [5]. Количественное содержание фенольных соединений в экстрактах определяли по окислительно-восстановительной реакции Фолина-Чикольте [6]. Содержание каротиноидов анализировали методом спектрофотометрии в пересчете на β -каротин [4].

Восстанавливающую способность экстрактов оценивали по методу FRAP [7]. Антиоксидантная активность экстрактов была исследована в реакции окисления Твин-80 кислородом воздуха [6]. Исследуя

антиоксидантную, в том числе железо-восстанавливающую, активность экстрактов использовали положительные контроли (образцы сравнения), а именно препараты, обладающие антиоксидантной активностью: кислота галловая, арбутин, кислота аскорбиновая, дигидрокверцетин.

Анализ противоопухолевой активности полученных экстрактов проводили методом подсчета клеток в камере Горяева, используя культуру клеток Нер-2 (карцинома гортани человека). В качестве контроля использовали перевиваемые линии клеток MDCK и Vero.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с помощью пакета компьютерных программ анализа данных Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Выделены в чистую культуру три штамма базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor* из плодовых тел, собранных с разных субстратов и с разных мест произрастания Новосибирской обл. Штамм Db-14 выделен из плодовых тел, собранных близ села Вьюны в Колыванском районе, штамм Db-18 – из плодовых тел, в окрестностях р.п. Кольцово в Новосибирском районе с березы *Betula pendula*, штамм Dr-17 – из плодовых тел, в окрестностях р.п. Кольцово с ивы *Salix alba*.

Исследуя культурально-морфологические особенности штаммов *Daedaleopsis tricolor*, выявлено, что в культуре они образуют плотные колонии сначала белого, а на 14–16 сутки роста – песочного или коричневого цвета. При микроскопическом исследовании (увеличение 400, 1000) наблюдается слабо разветвленный, септированный, мицелий с многочисленными пряжками одиночного типа, генеративные гифы бесцветные.

На основе выделенных штаммов методами глубинного и поверхностного культивирования на глюкозо-пептонной среде получена биомасса мицелия гриба *Daedaleopsis tricolor*. Содержание сухой биомассы мицелия гриба, выращенного глубинным способом в течение 7 суток, составляло от 5,1 до 7,4 г/л, в то время как для получения от 5,6 до 7,7 г/л сухой биомассы мицелия методом поверхностного культивирования потребовалось 33 суток.

Сухие экстракты из плодовых тел и культивируемого мицелия гриба *Daedaleopsis tricolor* охарактеризованы по физико-химическим параметрам. Все экстракты показали наличие полисахаридов, белка и фенольных соединений. Каротиноиды и тритерпены обнаружены в этанольных экстрактах, как из плодовых тел гриба, так и из мицелия, в то время как в водных экстрактах эти группы БАВ обнаружены

не были. Показано, что выход экстрактивных веществ из мицелия в 3–5 раз выше, чем из плодового тела, при этом содержание некоторых групп БАВ в экстрактах из плодовых тел гриба, в 2–4 раза выше, чем в экстрактах из мицелия. Содержание по-

лисахаридов в водных экстрактах гриба несколько выше, чем в этанольных, в то же время содержание фенольных соединений и флавоноидов в этанольных экстрактах гриба в целом выше, чем в водных экстрактах (табл. 1, 2).

Таблица 1

Физико-химические характеристики экстрактов из плодовых тел *Daedaleopsis tricolor* в зависимости от субстрата, на котором росли грибы

Экстракт	Место сбора	Субстрат	Содержание экстрактивных веществ, % ($M \pm m$) (n = 4)	Содержание белка, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)	Содержание полисахаридов, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)	Содержание каротиноидов, мкг/г ($M \pm m$) (n = 4)	Содержание фенольных соединений, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)	Содержание флавоноидов, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)
Этанольный	с. Вьюны	Береза	$5,0 \pm 0,3$	17 ± 4	331 ± 40	33 ± 2	$9,2 \pm 1,0$	11 ± 1
	р.п. Кольцово	Береза	$7,7 \pm 0,5$	11 ± 1	217 ± 26	39 ± 3	$6,2 \pm 0,1$	10 ± 1
	р.п. Кольцово	Ива	$9,5 \pm 1,0$	9 ± 1	268 ± 62	25 ± 2	$7,3 \pm 0,9$	13 ± 2
Водный	с. Вьюны	Береза	$8,8 \pm 0,7$	11 ± 2	393 ± 42	-	$4,9 \pm 0,3$	≤ 5
	р.п. Кольцово	Береза	$10,6 \pm 0,2$	10 ± 1	307 ± 12	-	$4,1 \pm 0,5$	≤ 5
	р.п. Кольцово	Ива	$14,3 \pm 2,0$	7 ± 1	300 ± 17	-	$4,0 \pm 0,6$	≤ 5

Примечание: М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; критерий Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Таблица 2

Физико-химические характеристики экстрактов из мицелия *Daedaleopsis tricolor*

	Экстракт	Штамм	Содержание экстрактивных веществ, %	Содержание белка, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)	Содержание полисахаридов, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)	Содержание каротиноидов, мкг/г ($M \pm m$) (n = 4)	Содержание фенольных соединений, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)	Содержание флавоноидов, мг/г ($M \pm m$) (n = 6)
Глубинное культивирование	Этанольный	Db-14	27	≤ 5	184 ± 16	45 ± 3	$2,4 \pm 0,3$	9 ± 2
		Db-18	24	≤ 5	70 ± 13	36 ± 3	$2,0 \pm 0,5$	7 ± 1
		Dr-17	25	≤ 5	37 ± 8	29 ± 2	$3,6 \pm 0,1$	≤ 5
	Водный	Db-14	23	≤ 5	121 ± 14	-	$2,3 \pm 0,1$	≤ 5
		Db-18	36	10 ± 1	104 ± 12	-	$1,9 \pm 0,1$	≤ 5
		Dr-17	27	≤ 5	86 ± 12	-	$3,2 \pm 0,5$	≤ 5
Поверхностное культивирование	Этанольный	Db-14	27	≤ 5	46 ± 3	20 ± 3	$\leq 1,8$	≤ 5
		Db-18	31	≤ 5	42 ± 11	19 ± 2	$2,8 \pm 0,2$	≤ 5
		Dr-17	23	≤ 5	37 ± 3	12 ± 2	$2,6 \pm 0,1$	≤ 5
	Водный	Db-14	31	7 ± 1	59 ± 6	-	$4,4 \pm 0,3$	≤ 5
		Db-18	36	≤ 5	52 ± 9	-	$3,6 \pm 0,4$	≤ 5
		Dr-17	32	7 ± 1	71 ± 11	-	$2,4 \pm 0,2$	≤ 5

Примечание: М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; критерий Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Известно, что избыточное образование в организме активных форм кислорода влечет за собой нежелательные реакции, лежащие в основе целого ряда заболева-

ний. Ранее было показано, что некоторые высшие базидиомицеты проявляют антиоксидантные свойства [2]. Нами установлено, что наибольшую антиоксидантную

активность в реакции окисления Твин-80 проявили экстракты из культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor*. В то же

время все экстракты гриба проявили низкую железо-восстанавливающую способность (табл. 3).

Таблица 3

Антиоксидантная активность экстрактов *Daedaleopsis tricolor*

	Вид сырья	Содержание сухого вещества, мг/мл	АОА, % ($M \pm m$) ($n = 4$)	BC
Этанольный экстракт	Плодовое тело (Село Вьюны; береза)	5,0	7 ± 3	0,3
	Плодовое тело (р.п. Кольцово; береза)	5,0	4 ± 1	0,4
	Плодовое тело (р.п. Кольцово; ива)	5,0	2 ± 1	0,5
	Мицелий (штамм Db-14)	5,0	13 ± 10	0,6
	Мицелий (штамм Db-18)	5,0	10 ± 4	0,4
	Мицелий (штамм Dr-17)	5,0	21 ± 9	0,6
Водный экстракт	Плодовое тело (Село Вьюны; береза)	5,0	13 ± 1	0,6
	Плодовое тело (р.п. Кольцово; береза)	5,0	8 ± 2	0,5
	Плодовое тело (р.п. Кольцово; ива)	5,0	11 ± 1	0,8
	Мицелий (штамм Db-14)	5,0	33 ± 1	0,3
	Мицелий (штамм Db-18)	5,0	17 ± 4	0,8
	Мицелий (штамм Dr-17)	5,0	32 ± 11	0,5
(K+)	Дигидрокверцетин	0,5	27 ± 7	10,5
	Кислота галловая	2,5	10 ± 2	20,1
	Арбутин	5,0	26 ± 4	8,1

Пр и м е ч а н и е : АОА – антиоксидантная активность в реакции окисления Твин-80 кислородом воздуха; BC – восстанавливающая способность (приравнивается к тангенсу угла наклона); (K+) – положительный контроль; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; критерий Стьюдента при $p \leq 0,05$.

В связи с тем, что наличие антиоксидантной активности препаратов может свидетельствовать о наличии противоопухолевых свойств, экстракты исследовали на цитотоксическую активность методом подсчета клеток. Для анализа противоопухолевой активности использовали клеточную линию Нер-2. Рассчитывали индексы пролиферации, оценивали рост клеток в зависимости от концентрации сухого вещества, определяли концентрацию, ингибирующую рост клеток на 50% (IC_{50}) для водных экстрактов, полученных из плодовых тел и мицелия гриба. Было выявлено, что IC_{50} водного экстракта из плодового тела гриба находилась в пределах 200–300 мкг/мл, а IC_{50} экстракта из мицелия – 100–115 мкг/мл. Таким образом, водный экстракт мицелия проявил более высокую антипролиферативную активность в отношении клеточной линии Нер-2, чем экстракт из плодового тела гриба. В связи с этим водный экстракт мицелия *Daedaleopsis tricolor* является перспективным агентом для разработки и получения противоопухолевого препарата. Исследуя токсичность на нормальных клетках, выявлено, что экстракты в концентрациях

до 2000 мкг/мл не оказывали токсического действия на клетки MDCK и *Vero*.

Результаты исследования биологической активности гриба *Daedaleopsis tricolor* свидетельствуют, что экстракты, полученные из выращенного в культуре мицелия гриба, показывают, как правило, более высокую биологическую активность в сравнении с экстрактами из плодовых тел данного базидиомицета.

Выводы

В чистую культуру выделено 3 штамма гриба *Daedaleopsis tricolor* из плодовых тел, собранных с разных субстратов. Экстракты, полученные из плодовых тел и сухой биомассы мицелия *Daedaleopsis tricolor*, охарактеризованы по основным группам биологически активных веществ. Выявлена антиоксидантная активность экстрактов из гриба *Daedaleopsis tricolor*. Показана антипролиферативная активность экстрактов *Daedaleopsis tricolor*. Проведено сравнение экстрактов, полученных из плодовых тел и культивируемого мицелия по биохимическому составу и биологической активности. Выявлено, что экстракты,

полученные из культивируемого мицелия гриба, в большинстве случаев показывают более высокую биологическую активность, чем экстракты, выделенные из плодовых тел. Проявление экстрактами биологической активности открывает перспективу использования гриба *Daedaleopsis tricolor* для разработки и получения лекарственных препаратов.

Список литературы

1. Ковалева А.В., Кузьминых О.В., Лашенко Е.Ю., Древал К.Г., Каниболоцкая Л.В., Бойко М.И., Шендрик А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих макромицетов // Вісник донецького національного університету. – 2013. – № 1. – С. 136–139.
2. Косогова Т.А. Штаммы базидиальных грибов юга Западной Сибири – перспективные продуценты биологически активных препаратов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук, 03.01.06. Кольцово, 2013. – 26 с.
3. Кудинова С.П., Казарян Р.В., Ремизова Е.Б., Кунщикова И.С. Патент РФ № 1730578. Способ определения количества β-каротина в белок содержащих продуктах.
4. Трошкова Г.П., Костина Н.Е., Проценко М.А., Скарнович М.А. Оптимизация технологии получения сухого экстракта из гриба *Fomes fomentarius* // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4.
5. Федосеева А.А., Лебедкова О.С., Каниболоцкая Л.В., Шендрик А.Н. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. – 2008. – № 3. – С. 123–127.
6. Bendiabdellah A., Dib M., Meliani N., Djabou N., Al-lali H., Tabti B. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus crinitus* Desf., from Algeria Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2012. – № 02 (07). – P. 92–95.
7. Ikekawa T., Nakanishi M., Uehara N., Chihara G., Fukuoka F. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus* // Jap. J. Canc. Res. – 1968. – № 59. – P. 155–157.
8. Eun-Mi Kim, Hae-Ryong Jung, Tae-Jin Min. Purification, Structure Determination and Biological Activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. Structure, Biological Activitie Substance in *D. tricolor* Bull. Korean Chem. Soc. – 2001. – V. 22. – № 1.

References

1. Kovaleva A.V., Kuzminyh O.V., Laschenko E.Yu., Dreval K.G., Kanibolotskaya L.V., Boyko M.I., Shendrik A.N., Visnik doneckogo nacionalnogo universitetu. 2013. no 1. pp. 136–139.
2. Kosogova T.A. Shtammy bazidialnyh gribov yuga Zapadnoy Sibiri – perspektivnye produtsenty biologicheskii aktivnyh preparatov: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk, 03.01.06. Koltsovo, 2013. 26 pp.
3. Kudinova S.P., Kazaryan R.V., Remizova E.B., Kunschikova I.S. Patent RF no 1730578. Sposob opredeleniya koli chestva β-karotina v belok sodержaschih produktah.
4. Troshkova G.P., Kostina N.E., Protsenko M.A., Skarnovich M.A., Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2012. no 4.
5. Fedoseeva A.A., Lebedkova O.S., Kanibolockaya L.V., Shendrik A.N., Himiya rastitelnogo syrya. 2008. no 3. pp. 123–127.
6. Bendiabdellah A., Dib M., Meliani N., Djabou N., Al-lali H., Tabti B. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus crinitus* Desf., from Algeria, Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2012. no 02 (07). – pp. 92–95.
7. Ikekawa T., Nakanishi M., Uehara N., Chihara G., Fukuoka F. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*, Jap. J. Canc. Res. 1968. no 59. pp. 155–157.
8. Eun-Mi Kim, Hae-Ryong Jung, Tae-Jin Min. Purification, Structure Determination and Biological Activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. Structure, Biological Activitie Substance in *D. tricolor* Bull. Korean Chem. Soc. 2001. V. 22. no 1.

Рецензенты:

Мазуркова Н.А., д.б.н., заведующая лабораторией препаратов природного происхождения, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово;

Белявская В.А., д.б.н., профессор, заведующая сектором отдела научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями особо опасных инфекций, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово.

Работа поступила в редакцию 05.12.2014.