

УДК 582.284:581

Е.Н. Алексеенко, И.В. Жерносекова, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,
пр. Гагарина 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
тел.: +38 (056) 374 47 34, e-mail: microviro@ Rambler.ru

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ СТРЕПТОМИЦЕТА НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ *PLEUROTUS OSTREATUS*

*Изучено действие культуральной жидкости штамма *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на накопление биомассы съедобных грибов вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном ее культивировании с добавлением глюкозы или аминокислотного препарата из автолизата пивных дрожжей. Было установлено, что культуральная жидкость стрептомицета в концентрации 0,01% и 0,1% способствовала более высоким показателям прироста биомассы гриба – 39%–44% в присутствии автолизата дрожжей, по сравнению с более низкими концентрациями 0,001% и 0,01% в питательной среде с добавлением глюкозы в качестве источника углерода.*

Ключевые слова: культуральная жидкость, мицелий, глубинное культивирование, стрептомицет, грибная биомасса, белково-пищевая добавка.

В настоящее время промышленное культивирование съедобных грибов является мощной индустрией, которая соединяет традиционные черты сельского хозяйства и современной биотехнологии. В связи с назревшей глобальной проблемой на планете — дефицитом белка, актуальными являются вопросы по разработке методов стимулирования роста, развития и урожайности съедобных грибов [13]. Известно, что для стимуляции растений, грибов часто используют биологически активные вещества (фитогормоны, витамины, аминокислоты) [7, 14]. Одним из продуцентов таких веществ является штамм *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 из коллекции культур кафедры микробиологии и вирусологии ДНУ, который синтезирует термостабильный регулятор роста гликопептидной природы, стимулирующий рост дрожжей и растений [15]. Представлялось целесообразным изучить возможность применения культуральной жидкости стрептомицета для повышения синтеза биомассы съедобных грибов.

Высший съедобный гриб — вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer), относится к группе сапрофитных дереворазру-



шающих базидиомицетов и является высокотехнологичным биообъектом [12]. Благодаря наличию активных оксидаз *Pleurotus* разрушает целлюлозо-лигнинный комплекс древесины и использует для своего питания углеродные соединения различной степени сложности [1]. При выращивании в глубинных условиях на жидких комплексных средах вешенка обыкновенная образует физиологически активную белковую биомассу с приятным грибным ароматом, которая может быть использована как посевная грибница для получения плодовых тел поверхностным способом на твердофазных субстратах по интенсивной технологии или как непосредственная пищевая добавка [20]. Сухой мицелий, полученный методом глубинного культивирования вешенки на жидкой среде, является ценным источником витаминов группы В, в особенности ниоцина, по содержанию которого грибы могут быть поставлены на одно из первых мест среди продуктов питания. Этот способ получения биомассы гриба вешенки обыкновенной дает также возможность получить кроме белка много физиологически активных веществ для медицинской промышленности. Глубинное культивирование на жидких питательных средах является наиболее экономичным процессом, что позволяет путем создания полностью контролируемых условий, достичь быстрого роста биомассы в промышленных условиях [12]. В настоящее время этот гриб является серьёзным конкурентом шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach.) — традиционного объекта промышленного грибоводства. Выбор грибов рода *Pleurotus* обусловлен отсутствием в них токсичных метаболитов [2, 4].

Целью настоящей работы было исследование влияния экзометаболических стрептомицета *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост мицелиальной биомассы съедобного гриба *P. ostreatus*, выращенного в глубинных условиях.

Материалы и методы

В качестве исследуемого объекта использовали чистую культуру гриба *Pleurotus ostreatus* (штамм Китайский черный) из коллекции музея культур грибов кафедры микробиологии и вирусологии ДНУ имени О. Гончара возрастом 5 суток, которая хранится на соево-агаровой среде, а также 72-часовую культуральную жидкость рифампициноустойчивого штамма 2P-15, отделенную от клеток стрептомицета центрифугированием при 5000 об/мин в течении 15 минут.

Биомассу вешенки получали путем культивирования гриба на жидкой питательной среде Гаузе с минеральными компонентами, содержащей (г/л): K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 1,0; $NaCl$ 0,5; $FeSO_4$ 0,01, воду водопроводную [18]. В указанную среду перед автоклавированием вводили культуральную жидкость (КЖ) *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 в следующих концентрациях: 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%. После стерилизации при $P=1,5$ атм. в опытные колбы вносили раствор стерильной



глюкозы в конечной концентрации 2% либо стерильный гидролизат пивных дрожжей 0,5%, 1% и 2%. Контрольные колбы КЖ не содержали. Затем все емкости засеивали 5-суточной агаровой культурой гриба в количестве 15 мг на одну колбу.

Глубинное культивирование проводилось на протяжении 5-ти суток при температуре 26–28 °С в условиях встряхивания на микробиологических термостатированных качалках в колбах емкостью 250 мл, с объемом питательной среды 50 мл. Накопление биомассы в ходе исследования определяли весовым методом, для этого по окончании ферментации глубинный мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через бумажные фильтры. Полученную биомассу гриба высушивали при температуре 105 °С до постоянного веса. Эксперименты проводили в трех повторностях для расчета достоверности использовали критерий Стьюдента на 5% уровне значимости [8].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований были получены экспериментальные данные прироста биомассы гриба в присутствии КЖ стрептомицета на фоне углеродного питания в качестве 2% глюкозы.

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что среда, в которой содержание КЖ составляло 0,01%, вызвала максимальное повышение биомассы на 32% по сравнению с контролем. Внесение КЖ в минимальной дозе 0,001% также оказало положительный эффект, который составил 19% прироста биомассы.

Таблица 1

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 2,0% глюкозы

Table 1

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P -15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 2,0% glucose

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	$\pm m$	
0,001	2,14 \pm 0,06*	119,0
0,01	2,38 \pm 0,07*	132,2
0,1	1,82 \pm 0,07	101,1
1,0	1,74 \pm 0,02	96,6
контроль	1,80 \pm 0,11	100,0

Примечание:* — разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.



Таким образом, при низких концентрациях КЖ стрептомицета в сочетании с 2% глюкозы в качестве источника углеродного питания наблюдалась стимуляция накопления биомассы вешенки. В других вариантах опыта, когда концентрация КЖ была 0,1% статистически значимых изменений не наблюдалось. Учитывая, что культуральная жидкость содержит стимулятор роста, становится ясным ее стимулирующее действие при низких концентрациях. Известно, что стимуляторы роста оказывают позитивный эффект, находясь в среде в малых концентрациях [14]. Ряд авторов показали, что под действием бактозоля — стимулятора роста из *Beijerinckia* sp. IBX — 84 в концентрациях 0,001%—0,1% увеличивалась клеточная масса бактерий рода *Rhizobium* в 1,4—1,6 раз [6].

На следующем этапе работы легко метаболизируемый источник углерода — глюкоза был заменен на автолизат пивных дрожжей, являющийся источником аминокислот, витаминов, макро- и микроэлементов, которые выступают факторами роста для микроорганизмов и грибов [3, 5, 11, 17]. В литературе большое количество публикаций посвящено изучению влияния дрожжевых экстрактов, автолизатов, гидролизатов на рост различных микроорганизмов. Так, убедительный эффект стимуляции роста продуцентов аминокислот и органических кислот был получен при внесении в питательные среды для коринебактерий и бифидобактерий дрожжевых экстрактов [19]. Также показана возможность кислотных и щелочных гидролизатов *C. guilliermondii* и *Sacch. vini* стимулировать рост молочнокислых бактерий, стрептококков и бифидобактерий [9]. Далее в работе изучали действие КЖ стрептомицета в сочетании 0,5%, 1,0% и 2,0% дрожжевого автолизата.

Таблица 2

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 0,5% автолизата пивных дрожжей

Table 2

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 0,5% autolysate of brewer's yeasts

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	±m	
0,001	1,62±0,09*	75,70
0,01	1,70 ±0,11 *	79,44
0,1	1,68±0,06 *	78,50
1,0	2,20±0,03	102,80
контроль	2,14±0,12	100,00

Примечание:* — разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.



Как видно из таблицы 2 на фоне низкой концентрации автолизата дрожжей (0,5%) ни одна из исследуемых концентраций КЖ не обеспечивала прирост биомассы вешенки. Большинство показателей биомассы не достигало контрольного уровня и было ниже на 21–24%. Можно предположить, что в питательной среде источник углерода не оптимальный.

Снижение концентрации КЖ стрептомицета до 0,001% в среде с 1,0% автолизата обеспечило достоверное стимулирование биомассы *Pleurotus* на 11,5% (табл. 3).

Таблица 3

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 1% автолизата пивных дрожжей

Table 3

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 1% autolysate of brewer's yeasts

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	±m	
0,001	2,90±0,03*	111,50
0,01	2,64±0,07	101,53
0,1	2,48±0,04	95,40
1,0	2,62 ±0,08	100,77
контроль	2,60±0,10	100,00

Примечание:* – разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.

В присутствии метаболитов стрептомицета наблюдалось достоверное повышение накопления грибной биомассы на 39,1%–44,3% на фоне дрожжевого автолизата в концентрации 2% (табл. 4). Очевидно, что подобранная концентрация КЖ прокариота (0,1%) в сочетании автолизата дрожжей (2%) является оптимальным условием для наибольшего прироста биомассы высших грибов. Полученные нами данные, относительно максимальных показателей биомассы гриба на фоне автолизата дрожжей в среде культивирования, хорошо соотносятся с исследованиями ряда авторов, где показано присутствие в среде культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 дрожжевого автолизата и микроэлементов, что позволило получить максимальные показатели (3,2) синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ, безразмерная величина) при использовании глицерина в качестве источника углерода и энергии. Исключение из среды дрожжевого автолизата приводило к снижению показателя условной концентрации ПАВ до 2,6 [10]. Кроме того, показатели синтеза ПАВ также



увеличивались при культивировании штамма на этаноле в присутствии дрожжевого автолизата и микроэлементов [16].

Таким образом, в условиях глубинного культивирования вешенки при добавлении КЖ стрептомицета на фоне источника углеродного питания глюкозы или дрожжевого автолизата удалось получить максимальный прирост грибной биомассы.

Таблица 4

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 2% автолизата пивных дрожжей

Table 4

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 2% autolysate of brewer's yeasts

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	$\pm m$	
0,001	6,96 \pm 0,07*	140,32
0,01	6,90 \pm 0,20*	139,11
0,1	7,16 \pm 0,01*	144,35
1,0	6,58 \pm 0,58	132,66
контроль	4,96 \pm 0,21	100,00

Примечание:* — разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.

Изучение механизмов стимулирующего воздействия культуральной жидкости штамма *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на накопление биомассы вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) в присутствии источников углерода и возможность их прикладного использования, на наш взгляд, представляет собой перспективное направление дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П., Дудка И.А., Кулеш М.Д., Соломко Э.Ф., Шевченко С.В. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. — К.: Наукова думка, 1983. — 312 с.
2. Бухало А.С. Сучасні тенденції культивування грибів із роду *Pleurotus* // Укр. ботан. журн. — 1990. — Т. 47, № 2. — С. 101–104.
3. Бухало А.С., Пархоменко Л.П., Марченко М.Н. Влияние различных источников углерода и азота в синтетических средах на рост базидиомицетов // Микол. и фитопатол. — 1972. — т. 6. — вып. 3. — С. 241–244.



4. Горленко М.В. Грибы как источник пищевых белков // Микология и фитопатология.— 1983. — Т. 17, № 3. — С. 177—180.
5. Гусарова Н.А., Низковская О.П., Семушкина Т.Н., Баранова П.И., Глущенко Н.В. Выращивание и отбор высших мицелиальных грибов, продуцентов белка на гидролизованных средах // Сб. тр. ВНИИ гидролиза растительных материалов, 1982. — № 32. — С. 94—101.
6. Косенко Л.В., Мандровская Е.Д., Кругова Е.Д., Варбанец Л.Д. Действие стимулятора роста растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* 250a и его азотоустойчивый мутант М-71 в условиях различной обеспеченности азотом // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 1. — С. 40.
7. Кузнецова О.В. Использование природных и синтетических регуляторов в промышленной микологии и солодоращении // Весник Днепропетровского университета. Биология. Экология. — 2010. — Т. 1, № 18. — С. 86—91.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
9. Михлина Э.Д., Радиной В.П. Активизация молочнокислых бактерий // Прикл. биохим. и микробиол. — М.:Изд-во Наука, 1981. — Т. 17, Вып. 3. — С. 348—367.
10. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иу-тинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином // Микробиологический журнал. — 2012. — Т. 74, № 1. — С. 20—27.
11. Сергійчук М.Г., Позур В.К., Вінніков А.І., Фурзікова Т.М., Жданова Н.М., Домбровська І.В., Швець Ю.В. Мікробіологія: Підручник. — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. — 375 с.
12. Середа Ю.Ю., Лебедева О.Н., Ляпустина Е.В., Зубарева И.М. Влияние состава питательных сред на рост глубинной культуры *Pleurotus ostreatus* // Хімія та сучасні технології: тези доповідей V міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (Дніпропетровськ, 20—22 квітня 2011 р.) — Дніпропетровськ, 2011. — С. 502.
13. Федорова Х.В., Лебедева О.М., Ляпустина О.В., Зубарева І.М. Підбір живильних середовищ для вирощування у глибинних умовах грибу *Pleurotus pulmonarius*. V міжнародна науково-технічна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених. Тези доповідей. I том. Дн.: ІнКомЦентр, 2011. — С. 510.
14. Цавкелова Е.А., Климова С.Б., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы — продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 133—143.



15. Чорногор Н.П. Дослідження рiстстимулюючих властивостей лiзо-ензимного препарату *Streptomyces recifensis* var. *Lyticus*: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.07. / К., 1998. — 20 с.

16. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of condition of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2009. — 45, № 3. — P. 272–278.

17. Yoshimoto T., Nakanishi T., Fukumoto J., Tsuru D. Studies on bacteriolytic enzymes. *Staphylococcus aureus* lytic enzyme from *Streptomyces* // *Agr. Biol. Chem.* — 1971. — V. 35, № 11. — P. 1775–1782.

18. Zadrzil F. Cultivation of *Pleurotus*. — In: The biology and cultivation of edible mushrooms / Eds Chang S.T., Hayes W.A. New York — San Francisco — London: Acad. press, 1978, P. 521–557.

19. А.с. 1065475 СССР, МКИ С 12N1/20 Питательная среда для культивирования коринебактерий дифтерии / И.Л. Маргулис, В.Н. Бочкова, Н.М. Головина и др. — Оpubл. 07.01.1984, Бюл. №1 // Открытия. Изобретения. — 1984. — № 23. — С. 170–171.

20. Пат. 2186851 Росія, ФРГ С12 Р21/00, С12 N1/14, С12 N1/14, С12 R1: 645. Способ получения биомассы гриба вешенки обыкновенной / Биттеева М.Б.(Росія); заявник та патентовласник Рос. наук. —дослідн. хім. та біотехн. ін. — т № - 2000120038, заявл. 31.07.01, опубл. 10.08.02, Бюл. № 6. — 4 с.

УДК 582.284:581

О.М. Алексєєнко, І.В. Жерносекова, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
тел.: +38 (056) 374 47 34, e-mail: microviro@rambler.ru

ВИВЧЕННЯ ДІЇ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ СТРЕПТОМІЦЕТА НА НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ *PLEUROTUS OSTREATUS*

Реферат

Досліджено дію культуральної рідини штама *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на накопичення біомаси їстівних грибів гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) при глибинному її культивуванні з додаванням глюкози або амінокислотного препарату з автолізу пивних дріжджів. Було встановлено, що культуральна рідина стрептоміцету в концентрації 0,01% та 0,1% сприяла більш високим показникам приросту біомаси



гриба — 39%—44% у присутності автолізата дріжджів, в порівнянні з більш низькими концентраціями 0,001% та 0,01% в поживному середовищі з додаванням глюкози в якості джерела вуглецю.

Ключові слова: культуральна рідина, міцелій, глибинне культивування, стрептоміцет, грибна біомаса, білково-харчова добавка.

УДК 582.284:581

O.M. Alekseenko, I.V. Zhernosekova, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarina str., Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine,
tel.: +38 (056) 374 47 34, e-mail: microviro@rambler.ru

**THE STUDY OF INFLUENCE OF CULTURAL LIQUID
OF STREPTOMYCETE ON ACCUMULATION OF BIOMASS
*PLEUROTUS OSTREATUS***

Summary

There were studied the effect of cultural liquid of strain *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the accumulation of biomass of edible mushroom *Pleurotus ostreatus* at its deep cultivation with addition of glucose or amino acid preparation from the autolysate of brewer's yeasts. It was determined that cultural liquid of streptomycete in concentration 0.01% and 0.1% promoted more instrumental in more high indexes of increase of biomass of mushroom — 39%—44% in presence the autolysate of yeasts, as compared to lower concentrations 0.001% and 0.01% in a nourishing environment with addition of glucose as a source of carbon.

Key words: cultural liquid, miceliy, deep cultivation, streptomycete, mushroom biomass, albumen food addition.

Одержано 12.03.2012.

