

**SELECTION OF NUTRIENT MEDIA FOR ENHANCED
PRODUCTION OF MYCELIAL BIOMASS BY SUBMERGED
CULTURE OF *Ganoderma lucidum* 1621**

N. N. Akhmetadykov¹, K. G. Mustafin¹, N. A. Bisko²,
Zh. B. Suleimenova¹, G. A. Al-Maali², Zh. K. Saduyeva¹

¹LLP research and production enterprise «AntiGen», Almaty region, kazakhstan,

²Institute of Botany named after N. G. Holodnyi NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine.

E-mail: biokhimii@mail.ru

Key words: *Ganoderma lucidum*, Basidiomycetes, biologically active compounds, biomass, submerged cultivation.

Abstract. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi) is a fungus which has been known to have numerous pharmacological effects including immunomodulating, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-diabetic, anti-oxidative, radical-scavenging, and anti-aging effects. It also contains a unique complex of biologically active metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral activity. An important advantage of higher fungi biomass production using biotechnological methods is unlimited opportunity and non-waste production, a readily available of raw materials. This article is devoted to studying the ability of *Ganoderma lucidum* 1621 to accumulate biomass in liquid media with different carbon and nitrogen sources under submerged cultivation. It was found that the strain of *G. lucidum* 1621 is biotechnologically promising object for biomass and exopolysaccharides production when cultivated on glucose-peptone-yeast medium. During cultivation on this medium the fungus accumulated $29,6 \pm 0,4$ g / l of biomass on the 5th day while the biomass yield was 46.8 g / l.

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПОВЫШЕННОГО СИНТЕЗА БИОМАССЫ ГРИБА *Ganoderma lucidum 1621* В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Н. Н. Ахметсадыков¹, К. Г. Мустафин¹, Н. А. Бисько²,
Ж. Б. Сулейменова¹, Г. А. Аль-Маали², Ж. К. Садуева¹

¹ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматинская область, Казахстан,

²Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, базидиомицеты, биологически активные соединения, биомасса, глубинное культивирование.

Аннотация. *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный) - базидиальный гриб, который содержит уникальный комплекс биологически активных метаболитов, обладающих антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активностью, а также оказывающих гиполипидемическое, гипогликемическое, иммуностимулирующее противоопухолевое и др. действие. Важным преимуществом получения биомассы высших грибов с помощью биотехнологических методов являются неограниченная возможность и безотходность производства препаратов, недефицитность сырьевых ресурсов. Настоящая статья посвящена изучению способности *Ganoderma lucidum 1621* накапливать биомассу на питательных средах с различными источниками углерода и азота в условиях глубинного культивирования. Установлено, что штамм *G. lucidum 1621* является биотехнологически перспективным объектом для получения биомассы и экзополисахаридов при культивировании на глюкозо-пептон-дрожжевой среде. На данной среде гриб уже на 5-е сутки культивирования накапливал 29,6±0,4 г/л биомассы, выход же биомассы по субстрату составил 46,8 г/л.

Введение. В настоящее время одним из приоритетных направлений биотехнологии и экспериментальной микологии является поиск и исследование новых конкурентоспособных и импортозамещающих перспективных источников получения лечебно-профилактических продуктов. Высшие базидиальные грибы *Ganoderma lucidum* (рейши), *Lentinus edodes* (шиитаке), *Inonotus obliquus* (чага) и многие другие собирались и использовались в течение многих сотен лет в Корее, Китае, Японии, и восточной России [1-3]. Одним из наиболее перспективных видов ксилотрофных грибов является базидиальный гриб *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный), который содержит уникальный комплекс биологически активных веществ.

Интенсивные исследования последних десятилетий привели к выявлению биологически активных метаболитов *G. lucidum*, обладающих антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активностью, а также оказывающих гиполипидемическое, гипогликемическое, иммуностимулирующее противоопухолевое и др. действие [4-7]. Мицелий *G. lucidum* состоит из 26-28% из углеводов, 3-5% липидов, 59% сырой клетчатки и 7-8% сырого протеина [8]. Более того, *G. lucidum* содержит большое количество биологически активных соединений, таких как терпеноиды, стероиды, фенолы, гликопroteины и полисахариды. Большинство авторов считают, что тритерпены и полисахариды являются основными физиологически активными компонентами гриба *G. lucidum* [9,10]. Так называемые полисахаридные иммуномодуляторы безусловно являются наиболее значительной группой современных лекарственных грибных препаратов, которые производятся и используются в Японии, Китае и других странах Юго-Восточной Азии как вспомогательные средства в терапии рака.

Однако промышленный выпуск таких препаратов имеет свои ограничения. Наиболее значимыми из них являются ограниченность природных источников исходного сырья и широкая вариабельность в содержании необходимых биологически активных соединений.

В настоящее время 70%-80% всех грибных препаратов получают из плодовых тел и 20%-30% - из экстракта мицелия грибов и культуральной жидкости [11-13]. Получение препаратов из плодовых тел обычно занимает несколько месяцев и, более того, в таких условиях очень трудно контролировать качество производимого продукта. Эти обстоятельства свидетельствуют о необхо-

димости разработки современных биотехнологических подходов на основе культивирования данных грибов в промышленных условиях. Важным преимуществом получения биомассы высших грибов с помощью биотехнологических методов являются неограниченная возможность и безотходность производства препараторов, недефицитность сырьевых ресурсов. Современные технологии культивирования лекарственных грибов базируются на фундаментальных знаниях об их биологических свойствах, что позволяет контролировать наиболее важные функции грибного организма и обеспечить получение биомассы мицелия и продукты метаболизма желаемого качества в необходимом количестве [14,15].

В этой связи, актуальным является проведение исследований, направленных на получение биомассы гриба *Ganoderma lucidum* в условиях глубинного культивирования.

Материалы и методы

Объектом исследований служил штамм *G. lucidum* 1621 из коллекции шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г.Холодного НАН Украины. Исходную культуру выращивали на сусло-агаре в течение 5-7 суток. Эксперименты ставили на лабораторных качалках (80 и 150 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл жидкой среды. Среды инокулировали гомогенизированной биомассой определенного штамма (10 % по объему) и инкубировали при температуре $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ [16]. Глубинное культивирование проводили на жидких средах следующего состава:

1) глюкозо-пептон-дрожжевая среда (ГПД), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дрожжевой экстракт – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,25; вода – 1 л.

2) нативная молочная сыворотка производства ОАО «Яготинского маслозавода», массовая часть (%): лактоза – 60; белок – 10; липиды – 2; молочная кислота – 7,85; витамины – 0,15; зола – 7.

3) нативная крахмальная крупка (отход производства ОАО «Кременянского крахмального завода») – 20,0 г; вода – 1 л. Состав, массовая часть (%): крахмал – 76,3; белок – 15,6; липиды – 1,3; эндополисахариды – 5,2; зола – 1,6.

До стерилизации кислотность всех сред доводили до определенных значений pH с помощью растворов 1N KOH и 1N HCl. Полученную биомассу отфильтровывали через капроновые фильтры и дважды промывали дистиллированной водой. Массу биомассы рассчитывали весовым методом по абсолютно сухому веществу после высушивания при температуре $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ до постоянного веса. В конце культивирования в культуральной жидкости измеряли значения pH.

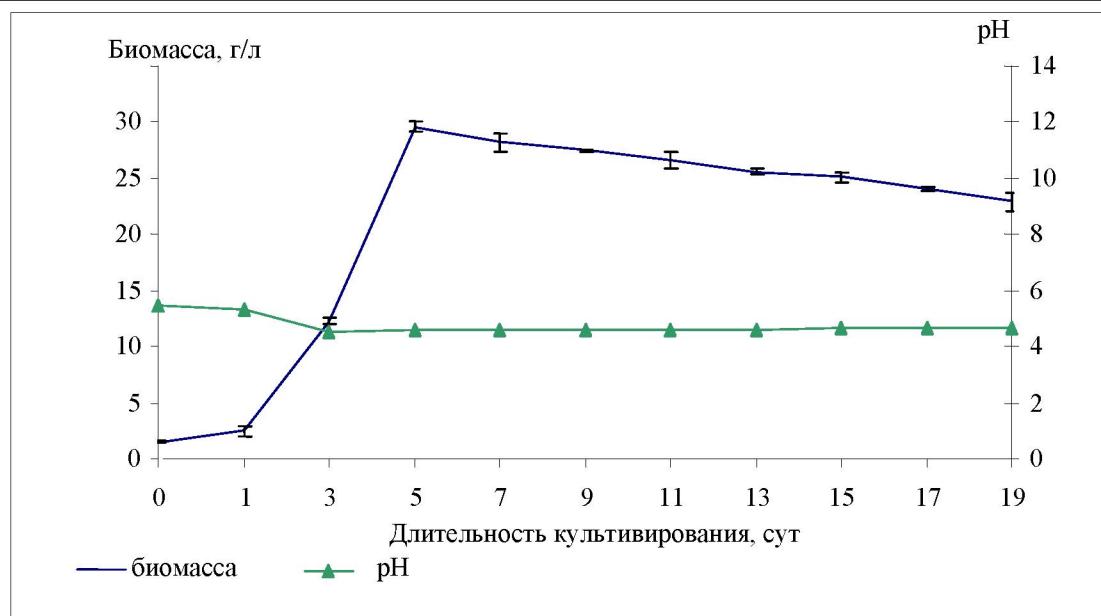
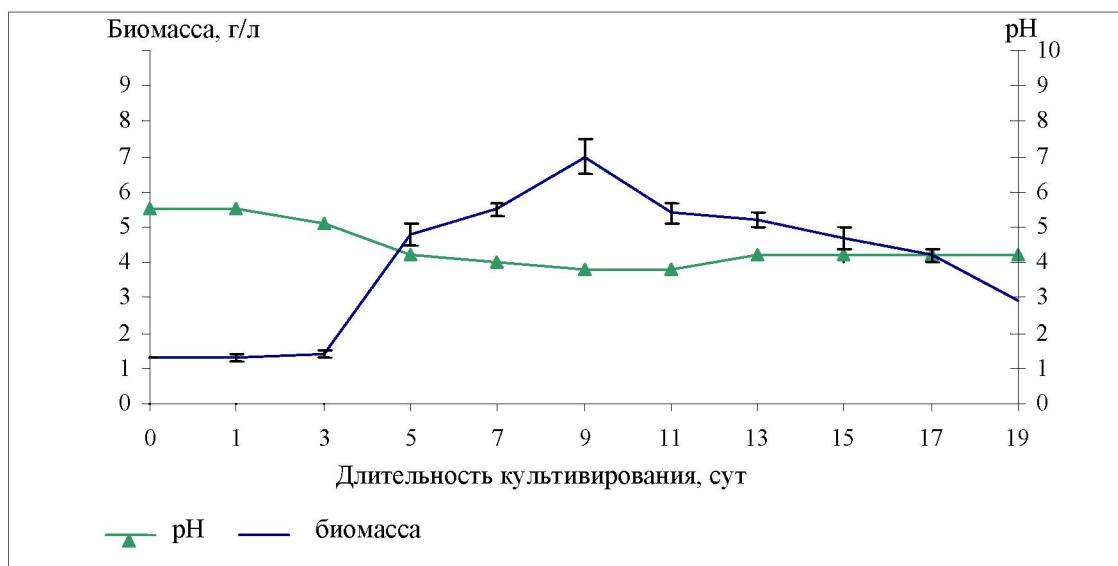
Результаты и их обсуждение

Для исследования роста штамма *G. lucidum* 1621 были взяты жидкие питательные среды с различными источниками углерода и азота: глюкозо-пептон-дрожжевая среда (ГПД), нативная молочная сыворотка и крахмальная крупка.

Количество синтезированной биомассы определяли в динамике один раз в 2-е суток в течение 19 суток в процессе глубинного культивирования на ГПД, нативной молочной сыворотке и на крахмальной крупке. В результате эксперимента получены данные по динамике накопления биомассы *G. lucidum* 1621 на выбранных питательных средах, которые подчинялись общим закономерностям развития микроорганизмов в условиях периодической культуры. Выявлены также определенные различия, которые выражались в длительности фаз роста и синхронности динамики роста культур.

Кривые роста *G. lucidum* 1621 – на глюкозо-пептон-дрожжевой среде (ГПД) почти с момента посева начинали подниматься вверх, достигая максимума на 5-6 сутки (рисунок 1).

Количество биомассы продолжало увеличиваться еще несколько суток, что соответствует фазе активного роста культур и затем скорость накопления начинало медленно снижаться. При этом средняя скорость накопления биомассы *G. lucidum* 1621 в активной фазе роста составила 5,6 г/л/сут, что выше, чем опубликованные в литературе данные [17 - 20]. Однако при культивировании на питательной среде с крахмальной крупкой этот штамм имел наименьшую среднюю скорость накопления биомассы – 0,95 г/л/сутки, что совпадает с результатами, полученными другими исследователями в процессе роста *G. lucidum* на синтетической среде с лактозой (рисунок 2) [16].

Рисунок 1 – Динамика роста и pH среды при культивировании *G. lucidum* 1621 на глюкозо-пептон-дрожжевой средеРисунок 2 – Динамика роста и pH среды при культивировании *G. lucidum* 1621 на среде с крахмальной крупкой

Средняя скорость образования биомассы на молочной сыворотке составила 2,05 г/л/сутки. Типичная стационарная фаза роста, когда рост отдельных клеток еще продолжается, но процесс размножения уравновешивается процессом гибели клеток, длилась 2-е суток. Эта фаза была представлена у исследованной культуры при культивировании на ГПД уже на 5-е сутки эксперимента, тогда как при культивировании на молочной сыворотке она начиналась только на 11-е сутки культивирования (рисунок 3).

Известно, что величина биомассы культур может значительно варьировать в зависимости от условий проведения экспериментов и биологических особенностей штаммов грибов. Так, согласно данным литературы разными штаммами *G. lucidum* синтезирована биомасса в количестве от 2,3 г/л до 22,1 г/л [17, 20]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что глюкозо-пептон-дрожжевая среда (ГПД) была более благоприятной средой для накопления биомассы. На этой среде штамм *G. lucidum* 1621 на 5-е сутки культивирования накапливал 29,6 ± 0,4 г/л биомассы. Выход биомассы гриба по субстрату составил 46,8 г/л. С практической точки зрения последнее является принципиально важным показателем.

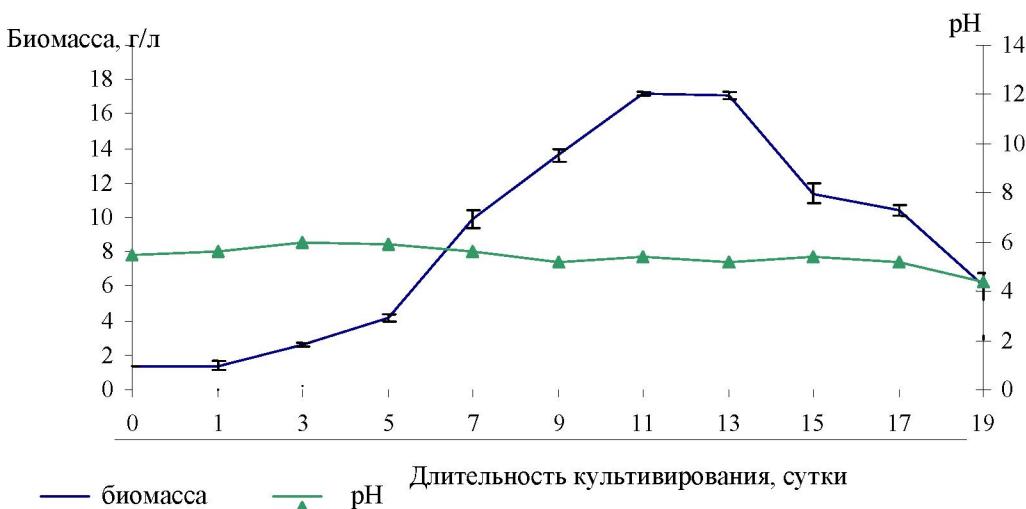


Рисунок 3 – Динамика роста и pH среды при культивировании на молочной сыворотке

Таким образом, по результатам работы установлено, что штамм *G. lucidum* 1621 является биотехнологически перспективным объектом для получения биомассы и экзополисахаридов при культивировании на глюкозо-пептон-дрожжевой среде.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems // Int. J. Med. Mushr. - 2010. – Vol. 12, №1. - P.1-16.
- [2] Chang S.-T., Miles P. G. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. – London; New York; Washington: CRC Press. - 2004. – 450 p.
- [3] Wasser S.P. Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives // Int. J. Med. Mushrooms. - 1999. - Vol. 1. - P.31–62.
- [4] Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nakanishi M, Fukuoka F. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms // Cancer Res. - 1969. - Vol. 29. - P. 734–735.
- [5] Ikekawa T et al. Antitumor polysaccharides of *Flammulinavelutipes*2. The structure of EA-3 and further purification of EA-5 // J. Pharmacobiol. Dyn. - 1982. - Vol. 5. - P. 576–581.
- [6] Ikekawa T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care // Int. J. Med. Mushrooms. - 2001. - N 3. - P. 291–298.
- [7] Russel R., Paterson M. *Ganoderma* – a therapeutic fungal biofactory // Phytochemistry. – 2006. – Vol. 67. – P. 1985-2001.
- [8] Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. Food Research International. 2001, 34(6), P.521-526.
- [9] Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds // Biotechnol Annu Rev. 2007, 13, P.265-301.
- [10] Zhou XW. et al. *Ganodermataceae*: Natural products and their related pharmacological functions // American Journal of Chinese Medicine. 2007, 35(4):559-574.
- [11] Chang S.T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution // Int. J. Med. Mushr. 1999. -№ 1, -P. 1-7.
- [12] Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions // Chem. Rec. 2003. 3(3), P. 172-80.
- [13] Deng Pan et al. Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from *G. lucidum* fruiting bodies // Food Chemistry. 2012. –Vol. 135, -№ 3, -P. 1097–1103.
- [14] Ricardo Wagner, David Alexander Mitchell, Guilherme Lanzi Sasaki, Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide // J. of Biotechnol. 2004. – Vol. 114, № 1–2. - P. 153–164.
- [15] Peng Xu, Zhong-Yang Ding, Zhu Qian, Chang-Xin Zhao, Ke-Chang Zhang Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media // Enzyme and Microbial Technol. 2008. – Vol. 42, № 4. – P. 325–331.
- [16] Бухало А.С., Соломенко Э.Ф., Пархоменко Л.П., и др. Опыт глубинного выращивания *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. на комплексных средах // Производство высших съедобных грибов СССР. - Киев: Наук. думка, 1978. - С. 29-32.
- [17] Tang Y-J., Zhong J.-J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganodericacid // Enz. Microb. Technol. – 2002. – Vol. 31. – P. 20-28.

- [18] Смирнов Д. А. Углеводы глубинной культуры *Ganoderma lucidum*: образование, характеристика. Автографат дис. ... канд. биол. наук. – Минск, 2007. – 23 с.
- [19] Wagner R., Mitchell D. F., Sasaki G. L. Et al. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide // J. Biotechnol. – 2004. – Vol. 114. – P. 153-164.
- [20] Щерба В. В., Бабицкая В. Г. Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – Vol. 44, № 1. – С. 90-95.

REFERENCES

- [1] Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems // Int. J. Med. Mushr. - 2010. – Vol. 12, №1. – P.1-16 (in Eng.).
- [2] Chang S.-T., Miles P. G. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. – London; New York; Washington: CRC Press. - 2004. – 450 p. (in Eng.).
- [3] Wasser S.P. Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives // Int. J. Med. Mushrooms. - 1999. - Vol. 1. - P.31–62 (in Eng.).
- [4] Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nakanishi M, Fukuoka F. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms // Cancer Res. - 1969. - Vol. 29. - P. 734–735 (in Eng.).
- [5] Ikekawa T et al. Antitumor polysaccharides of Flammulinavelutipes2. The structure of EA-3 and further purification of EA-5 // J. Pharmacobiol. Dyn. - 1982. - Vol. 5. - P. 576–581 (in Eng.).
- [6] Ikekawa T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care // Int. J. Med. Mushrooms. - 2001. - N 3. - P. 291–298 (in Eng.).
- [7] Russel R., Paterson M. Ganoderma – a therapeutic fungal biofactory // Phytochemistry. – 2006. – Vol. 67. – P. 1985-2001 (in Eng.).
- [8] Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. Food Research International. 2001, 34(6), P.521-526 (in Eng.).
- [9] Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds // Biotechnol Annu Rev. 2007, 13, P.265-301 (in Eng.).
- [10] Zhou XW. et al. Ganodermataceae: Natural products and their related pharmacological functions // American Journal of Chinese Medicine. 2007, 35(4):559-574 (in Eng.).
- [11] Chang S.T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution // Int. J. Med. Mushr. 1999. -№ 1, -P. 1 7 (in Eng.).
- [12] Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions // Chem. Rec. 2003. 3(3), P. 172-80 (in Eng.).
- [13] Deng Pan et al. Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from *G. lucidum* fruiting bodies // Food Chemistry. 2012. –Vol. 135, -№ 3, -P. 1097–1103 (in Eng.).
- [14] Ricardo Wagner, David Alexander Mitchell, Guilherme Lanzi Sasaki, Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide // J. of Biotechnol. 2004. – Vol. 114, № 1-2. - P. 153–164 (in Eng.).
- [15] Peng Xu, Zhong-Yang Ding, Zhu Qian, Chang-Xin Zhao, Ke-Chang Zhang Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media // Enzyme and Microbial Technol. 2008. – Vol. 42, № 4. – P. 325–331 (in Eng.).
- [16] Buhalo A.S., Solomko Je.F., Parhomenko L.P., i dr. Opty glubinnogo vyrashhivaniya Pleurotus ostrestus (Fr.) Kumm. na kompleksnyh sredah // Proizvodstvo vysshih s#edobnyh gribov SSSR. - Kiev: Nauk. dumka, 1978. - S. 29-32 (in Russ.).
- [17] Tang Y-J., Zhong J.-J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid // Enz. Microb. Technol. – 2002. – Vol. 31. – P. 20-28 (in Eng.).
- [18] Smirnov D. A. Uglevody glubinnoj kul'tury *Ganoderma lucidum*: obrazovanie, harakteristika. Avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk. – Minsk, 2007. – 23 c. (in Russ.).
- [19] Wagner R., Mitchell D. F., Sasaki G. L. Et al. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide // J. Biotechnol. – 2004. – Vol. 114. – P. 153-164 (in Eng.).
- [20] Shherba V. V., Babickaja V. G. Polisaharidy ksilotrofnyh bazidiomicetov // Prikl. biohim. i mikrobiol. – 2008. – Vol. 44, № 1. – S. 90-95 (in Russ.).

ТЕРЕҢ ДАҚЫЛДАУ ЖАҒДАЙЫНДА *Ganoderma lucidum* 1621 САНЫРАУҚҰЛАҒЫ БИОМАССАСЫНЫң ЖОҒАРЫ СИНТЕЗІ ҮШІН ОҢТАЙЛЫ ҚОРЕКТІК ОРТА ТАҢДАУ

Н.Н. Ахметсадыков¹, К.Г. Мустафин¹, Н.А. Бисъко²,
Ж.Б. Сулейменова¹, Г.А. Аль-Маали², Ж.К. Садуева¹

¹ЖШС «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны, Алматы облысы, Қазақстан,

²Н. Г. Холодный атындағы ботаника институты Украина ҰФА, Киев, Украина

Тірек сөздер: *Ganoderma lucidum*, базидиомицеттер, биологиялық белсенді қосылыстар, биомасса, терен дақылдау.

Аннотация. *Ganoderma lucidum* (рейша санырауқұлағы) – антибактериалды, санырауқұлакқа қарсы және вируска қарсы белсенділікке ие, сонымен катар гиполипидемиялық, гипокликемиялық, иммуностимулдеуші, ісікке қарсы және т.б. әсері бар биологиялық бірегей белсенді метаболиттердің жыныстығын құрайтын базидиалды санырауқұлак. Биотехнологиялық әдістер көмегімен жоғары санырауқұлактардың биомассасын алудың маңызды тиімділігі үздіксіз мүмкіндік және қалдықсыз препарат өндірісі, жеткілікті шикізат көздері болып табылады. Негізгі мақала терен дақылдау жағдайында әр түрлі көміртегі және азот көздері бар қоректік орталарда *Ganoderma lucidum* 1621 биомасса жинақтау қабілеттілігін зерттеуге арналған. Глюкозапептон-ашытқы қоректік ортасында дақылдаған кезде *G. lucidum* 1621 штаммы биомасса және экзополисахарид алу үшін биотехнологиялық перспективті объектісі екені анықталды. Бұл қоректік ортада санырауқұлак 5 тәулік дақылдау кезінде $29,6 \pm 0,4$ г/л биомасса жинақтады, ал субстрат бойынша биомассаның шығуы 46,8 г/л құрады.

Поступила 10.02.2016 г.