

Biological sciences

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 2224-5227

Volume 1, Number 329 (2020), 5 – 10

<https://doi.org/10.32014/2020.2518-1483.1>

UDC 604.4:582.28

K.G. Mustafin¹, N.A. Bisko², A.K. Kalieva³, I.E. Tapenbayeva⁴

¹University of Power Engineering & Telecommunications, Almaty, Kazakhstan;

² Mycology Department of the Institute of Botany, Kiev, Ukraine;

³Aktobe Regional State University named after K. Zhubanov, Kazakhstan;

⁴RPE Co “Antigen”, Almaty, Kazakhstan

aika90aiko@mail.ru

DETERMINATION OF THE PROTEINS, LIPIDS AND FATTY ACIDS IN *LENTINUS EDODES* MYCELIUM BIOMASS

Abstract. Higher *Basidiomycete* mushrooms are currently of interest because they are a rich source of various bioactive natural products. *Lentinus edodes* is one of the most promising species of xylotrophic fungi. In this paper crude proteins, lipids and fatty acids in the deep mycelium of *L. edodes* 2541 have been determined. It was shown that the total protein content in the fungal biomass was 23.0%, and lipids - 7%. Analysis of the fatty acid composition of the deep mycelium of *L. edodes* 2541 showed that it is dominated by polyunsaturated diene linoleic (C18: 2) acid - 69% of the total fatty acids. Polyunsaturated fatty acids are indispensable components of nutrition, because, like essential amino acids, they cannot be synthesized in the human body. It was demonstrated that in the composition of the lipids of the strain *L. edodes* 2541 the amount of unsaturated fatty acids (75%) significantly exceeds the amount of saturated fatty acids (24%). In this regard, the degree of lipids unsaturation was 1.46.

Key words: *Lentinus edodes*, proteins, lipids, fatty acids.

Introduction

Currently, there is increased attention to the creation of food additives and therapeutic and prophylactic drugs that can be used to regulate physiological functions in the human body. Promising objects in this direction are higher basidial mushrooms, as they contain a unique complex of biologically active substances of carbohydrate, lipid and phenolic nature, vitamins, trace elements and other vital compounds for the human body [1, 2]. These fungi have pronounced immunomodulatory, hepatoprotective, antidiabetic, antiviral and antimicrobial properties [3, 4]. In particular, they are a source of new polysaccharides with antitumor and immunomodulatory properties. One of the most widely cultivated species of edible xylotrophic fungi is *Lentinus edodes* (shiitake), which has been widely used in Chinese medicine for more than two millennia.

The fruit bodies of this fungus are grown on an industrial scale in many countries of the world [5]. In addition to excellent taste, shiitake mushrooms are widely used in Chinese medicine for more than two millennia. Fruit bodies of *L. edodes* contain proteins (26% of dry weight), lipids, including fatty acids (mainly linolenic acid); carbohydrates; minerals; vitamins B₁, B₂ and C; ergosterols [6, 7]. It is known that the most scarce component in the diet of people is a complete protein. Proteins of *L. edodes* fruit bodies contain 18 amino acids included in the formula of a balanced diet, of which the essential ones are of particular value: lysine, threonine, valine, tryptophan, tyrosine, etc. The content of essential amino acids in the fruit bodies of various species of edible mushrooms cultivated on plantations can be quite high, reaching and even exceeding 40% of the total amount of amino acids.

In addition to protein, it is now well known that some microorganisms, including basidiomycetes, are able to synthesize lipids and highly active lipid components in sufficiently large quantities. Fungal lipids are represented by mono-di- and triglycerides, sterols and phospholipids [8, 9]. Due to high nutritional values, the majority of research programs had been focused on extract from the fruiting body and there have been fewer studies on extract from the cultivated fungi. In spite of many researchers' efforts for the production of bioactive metabolites by mushrooms, the physiological and engineering aspects of submerged cultures (production kinetics, structural features, biological activity and biosynthesis control methods of some bioactive compounds) are still far from being thoroughly studied [10, 11].

The aim of this study was determination of the content of crude protein, lipids and fatty acids in the mycelia biomass of *Lentinus edodes*.

Materials and methods

The object of research was *L. edodes* 2541. For determination of the protein and lipids optimized nutrient medium has been used. The composition of the medium was as a follow (g/l): cellobiose - 30; KH₂PO₄ - 1; K₂HPO₄ - 1; MgSO₄ - 0.25; peptone - 3.5; yeast extract - 20ml; pH-6. The experiments were carried out on laboratory shaker (180 rpm) in 250 ml Erlenmeyer flasks with 50 ml of medium for 7 days. The aeration intensity was 0.55g O₂/l/h. Sterile nutrient media were inoculated with homogenized biomass of *L. edodes* 2541 strain (10% by volume). Cultivation temperature - 25°C. After cultivation, the fungal mycelium of was separated from the culture fluid through a nylon cloth, repeatedly washed with water, dried at 60°C to a constant weight, crushed and used for chemical analyses.

Total nitrogen content (N) in the mycelium was determined by Kjeldahl, the content of crude protein (total protein) was calculated as N_{total} × 6.25. Amino acid composition of proteins was studied on the analyzer of amino acids "AAA-881" ("Miasrotechna", Czech Republic).

Lipids were extracted by the Folch method [12], the fatty acid composition of lipids was analyzed as methyl esters of fatty acids on a gas-liquid chromatograph "Chrom-5" (Czech Republic) with a flame ionization detector, using a stainless steel column 3.7 m long, filled with n-AW chromatofix with 15% polyethylene glycol succinate in the isothermal mode at an evaporator temperature of 210°C and a column temperature of 160°C. Identification of fatty acids was carried out by relative retention volumes, as well as in comparison with the indicators of control methyl esters of fatty acids [13, 14]. All the analyses were performed in triplicate, and the results were expressed as mean SD values of the three sets of observations. The mean values and standard deviation was calculated using STATISTICA 6 [15].

Results and discussion

In order to more accurately characterize the objects of research at the first stage, we conducted experiments to study the level of accumulation of crude protein and lipids in the conditions of deep cultivation. The efficiency of synthesis in this case was estimated by the amount of these substances per unit of synthesized biomass. The test strains were grown on an optimized liquid medium, as indicated in the above. The results are presented in Table 1.

The protein content of 20 strains ranges from 8 to 19%. At the same time, the protein content of 11 strains reached 20-23%. The maximum protein content of 23% was observed in strains 2541, 65, 2022 and 2267.

Comparative characteristics of lipid accumulation revealed variability from 3% to 7% to absolute dry weight. The main part of the strains contained 6-7% lipids. Comparative analysis of the studied properties of these strains, including previously obtained data on biomass synthesis, allowed to select strain *L. edodes* 2541 as the most promising producer. It was found that in the fruit bodies of *L. edodes*, as in a number of other basidial fungi, lipids do not exceed 5-6% by weight, and, as a rule, their content is higher in the cap than in the leg. This is because the basidiospores in the cap are very rich in lipids. Comparison of lipid composition of fruit bodies of *L. edodes* with fruit bodies of widely cultivated edible fungi *A. bisporus* (champignon) and *P. ostreatus* (oyster mushroom) showed that the main features peculiar to lipids of fungi of the Basidiomycetes class (prevalence of C18:2, high values of the degree of unsaturation (CH) of lipids (1,4-1,5) were found in shiitake. However, this fungus has a number of differences, for example, a high level of palmitic (C16:0), the presence of palmitoleic (C16:1) acid.

Table 1 - Crude protein and lipids content in different strains of *L. edodes*, %

The number of the strain	Crude protein	Lipids
1	2	3
55	17	5
2541	23	7
57	20	6
65	23	7
503	13	4
504	20	6
1712	19	6
2082	19	6
711	21	6
712	21	7
713	19	6
1500	17	5
1501	18	5
1628	16	5
1658	20	6
1659	20	6
1973	18	6
1992	18	6
2022	23	7
2023	21	6
2056	18	6
1709	15	5
1711	8	2
2059	7	2
1710	11	3
1	2	3
2180	16	5
2267	23	7
2084	12	4
2085	12	4
2914	10	3
507	17	5

The results of determination of fatty acid composition of fungal biomass *L. edodes* 2541 are presented in Table 2.

Table 2 - Fatty acid composition of deep mycelium of *L. edodes* 2541

Indicators	% of the amount of fatty acids	
	Trivial name of the fatty acid	Systematic name (IUPAC) of fatty acid
Saturated fatty acids		
Lauric (C _{12:0})	Dodecanese	-
Myristic (C _{14:0})	Tetradecane	0,73±0,01
Pentadecyl (C _{15:0})	Pentadecane	1,58±0,04
Palmitic (C _{16:0})	Hexadecane	19,23±0,50
Margarine (C _{17:0})	Hexadecane	0,45±0,01
Stearic(C _{18:0})	Octadecane	2,30±0,05
Unsaturated fatty acids		
Palmitoleic (C _{16:1})	Cis-9-hexadecene	0,85±0,01
Heptadecene(C _{17:1})	Cis-9-heptadecene	0,45±0,01
Oleic(C _{18:1})	Cis-9-octadecene	3,79±0,03
Polyunsaturated fatty acid		
Oleic (C _{18: 2})	Cis, Cis-9,12-octadecadiene	69, 42 ±1,20
α-Linolenic(C _{18: 3})	Cis,Cis,Cis-9,12,15-octadecatrienoic	0,90±0,30
CH (degree of lipid unsaturation)		1,46±0,01
Sum of saturated fatty acids		24,29±0,61
Sum of unsaturated fatty acids		75,41±2,00

The data presented in Table 2 demonstrate that polyunsaturated linoleic acid (C18:2) prevails in the composition of lipids of the studied *L. edodes* strain – 69% of the total fatty acids. It should be noted that the main fatty acid of many vegetable oils (sunflower, soybean, corn, cotton) is also linoleic acid, the content of which is 50-70%.

In the biomass lipids of the studied strain, 3 types of unsaturated fatty acids are present in small quantities. It was found that among the saturated fatty acids in the lipids of the strain *L. edodes* 2541, monoenoic palmitic (C16:0) acid content was 19%. It was found that the number of unsaturated fatty acids (75%) in the lipids of the strain *L. edodes* 2541 significantly exceeds the number of saturated fatty acids (24%). In this regard, the degree of lipid unsaturation was 1.46.

In the fruit bodies of shiitake mushroom, fatty acids make up 3-3. 4% of the lipid content. Their composition includes following acids: linoleic (C18:2) – 72.8%, palmitic (C16:0) – 14.7%, oleic (C18:1) – 3.0%, tetradecene (C14:1) – 1.6%, stearic (C18:0) – 0.9% and myristic (C14:0) - 0.1%.

Thus, the obtained data indicate a high nutritional value of the deep mycelium of *L. edodes* 2541.

К.Г. Мустафин¹, Н.А. Биско², А.К. Калиева³, И.Е. Тапенбаева⁴

¹ Алматы Энергетика және байланыс университеті, Алматы;

² Ботаника институтының Микология кафедрасы, Киев, Украина;

³Қ. Жұбанов атындағы Ақтөбе өнірлік мемлекеттік Университеті;

⁴ЖШС «Антigen FOK», Алматы, Қазакстан

LENTINUS EDODES САНЫРАУҚҰЛАҒЫ БИОМАССАСЫНДАҒЫ ПРОТЕИНДЕР, ЛИПИДТЕР МЕН МАЙ ҚЫШҚЫЛДАРЫНЫҢ ҚҰРАМЫН АНЫҚТАУ

Аннотация. Жоғары базидиальды санырауқұлақтар қазіргі биотехнологияның болашағы бар обьектілері болып табылады. Өйткені құрамында көмірсулар, липидті және фенолды табиғаттың биологиялық белсенді заттарының бірегей кешені, витаминдер, микроэлементтер және басқада адам ағзасы үшін маңызды қосылыстар бар. Бұл санырауқұлақтар иммунитет қалыптастыруышы, гепатопротекторлық, диабетке карсы, вирусқа қарсы және антимикробтық қасиеттерге ие. *Lentinus edodes* ксилотрофты санырауқұлактардың ішіндегі перспективті түрлерінің бірі болып табылады. Бұл зерттеу терендетілген *L.edodes* санырауқұлағының 32 штаммының мицелийіндегі шикі протеин, липидтер мен май қышқылдарының құрамын зерттеуге арналған. Орташа есеппен 20 штаммдағы протеиннің мөлшері 8-ден 19 %-ға дейін, ал 11 штаммда протеиннің мөлшері 20-23 %-ға жетті. 4 штамда протеиннің ең көп мөлшері 23 %-ды құрайтыны байқалды. Жасушалардың тіршілігі барысындағы бірқатар үдерістерде акуыздардан басқа липидтер де маңызды (ақпарат беру, метаболиттер секрециясы және т.б.) ерекше рөл атқарады. Осыған байланысты зерттелетін штамдардың зерттеу ерекше қызығушылық тудырды. Липидтердің жинақталуының салыстырмалы көрсеткіші, штамдардың негізгі белгінің құрамында 6-7 % липидтер бар екендігін көрсетті. Зерттелген штамдардың қасиеттерін салыстырмалы талдау *L. edodes* 2541 штамын ең перспективті продуктент ретінде таңдал алуға мүмкіндік берді. Сонымен, санырауқұлақ *L.edodes* 2541 штаммының биомассасындағы жалпы акуыздың мөлшері 23,0 %, липидтер – 7 % екендігі белгілі болды. Санырауқұлақ мицелийіндегі тағамдық құндылығына неғұрлым дәлірек көз жеткізу үшін май қышқылдарының, әсіресе, тағамның алмастырылмайтын компоненттері болып табылатын поликанықпаған май қышқылдарының құрамына талдау жүргізілді. Өйткені, олар алмастырылмайтын аминқышқылдары сияқты адам ағзасында синтезделе алмайды. Шиитаке санырауқұлағының жемісті денелерінде май қышқылдары липидтер құрамының 3-3,4 % құрайтыны белгілі. Олардың құрамына: линол (C_{18:2}) – 72,8 %, пальмитин (C_{16:0}) – 14,7 %, олеин (C_{18:1}) – 3,0%, тетрадецен (C_{14:1}) – 1,6%, стеарин (C_{18:0}) – 0,9% және миристин (C_{14:0}) – 0,1 % қышқылдары кіреді. Терендетілген *L. edodes* 2541 мицелий липидтерінің майқышқылдары құрамын талдау онда поликанықпаған динеді линол (C_{18:2}) қышқылы – майлы қышқылдардың мөлшерінен 69% басым екенін көрсетті. Поликанықпаған май қышқылдары тағамның алмастырылмайтын компоненттері болып табылады. Өйткені, олар алмастырылмайтын аминқышқылдары сияқты адам ағзасында синтезделе алмайды. Зерттелетін штамның биомассасының липидтерінде аз мөлшерде қанықпаған май қышқылдарының 3 түрі бар. Зерттелген *L.edodes* 2541 штаммының липидтері құрамында поликанықпаған динеді линол (C_{18:2}) қышқылы – майлы қышқылдардың мөлшерінен 69 % басым екенін анықталды. *L.edodes* 2541 штаммының липидтеріндегі қанықкан май қышқылдарының арасында құрамы май қышқылдардың мөлшерінен 19%-ды құрайтын моноен пальмитин қышқылы (C_{16:0}) басым болды.

L. edodes 2541 штаммының липидтері құрамында қанықпаған май қышқылдарының мөлшері (75 %) қанықкан май қышқылдарының мөлшерінен (24 %) едәүір асады. Осыған байланысты липидтердің қанықпаушылық дәрежесі 1,46-ны құрайды.

Түйін сөздер: *Lentinus edodes*, протеиндер, липидтер, май қышқылдары.

К.Г. Мустафин¹, Н.А. Биско², А.К. Калиева³, И.Е. Тапенбаева⁴

¹Алматинский Университет Энергетики и Связи, Алматы;

²Кафедра микологии Института ботаники, Киев, Украина;

³Актыбинский региональный государственный университет имени К. Жубанова;

⁴ТОО НПП «Антиген», Алматы, Қазақстан

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕИНОВ, ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОМАССЕ ГРИБА *LENTINUS EDODES*

Аннотация. Высшие базидиальные грибы являются перспективными объектами современной биотехнологии, поскольку содержат уникальный комплекс биологически активных веществ углеводной, липидной и фенольной природы, витамины, микроэлементы и другие жизненно важные для человеческого организма соединения. Эти грибы обладают выраженными иммуномодулирующими, гепатопротекторными, антидиабетическими, антивирусными и antimикробными свойствами. *Lentinus edodes* является одним из наиболее перспективных видов ксилотрофных грибов. Настоящее исследование посвящено изучению содержания сырого протеина, липидов и жирных кислот в глубинном мицелии 32 штаммов гриба *L. edodes*. В среднем содержание протеина у 20 штаммов колебалось от 8 до 19%, у 11 штаммов количество протеина достигало 20-23%. Максимальное же содержание протеина, составляющее 23% наблюдалось у 4 штаммов. Помимо белков липиды играют особую роль в ряде жизненно важных процессов в клетках (передаче информации, секреции метаболитов и т.д.). В связи с этим, особый интерес представляло определение количества липидов глубинного мицелия исследуемых штаммов и изучение их жирнокислотного состава. Сравнительная характеристика накопления липидов показала, что основная часть штаммов содержала 6-7% липидов. Сравнительный анализ изученных свойств исследуемых штаммов позволил отобрать как наиболее перспективный продуцент штамм *L. edodes* 2541. Таким образом, было установлено, что содержание общего белка в грибной биомассе штамма *L. edodes* 2541 составляет 23,0%, липидов – 7%. Для более точной характеристики пищевой ценности грибного мицелия был проведен анализ содержания жирных кислот, и особенно, полиненасыщенных жирных кислот, которые являются незаменимыми компонентами питания, поскольку, как и незаменимые аминокислоты, не могут быть синтезированы в организме человека. Известно, что в плодовых телах гриба шиитаке жирные кислоты составляют 3-3,4% от содержания липидов. В их состав входят кислоты: линолевая ($C_{18:2}$) – 72,8%, пальмитиновая ($C_{16:0}$) – 14,7%, олеиновая ($C_{18:1}$) – 3,0%, тетрадеценовая ($C_{14:1}$) – 1,6%, стеариновая ($C_{18:0}$) – 0,9% и миристиновая ($C_{14:0}$) – 0,1%. Анализ жирнокислотного состава липидов глубинного мицелия *L. edodes* 2541 показал, что в нем преобладает полиненасыщенная диеновая линолевая ($C_{18:2}$) кислота – 69% от суммы жирных кислот. Полиненасыщенные жирные кислоты являются незаменимыми компонентами питания, поскольку, как и незаменимые аминокислоты, они не могут быть синтезированы в организме человека. В липидах биомассы изучаемого штамма в небольших количествах присутствуют 3 вида насыщенных жирных кислот. Установлено, что в составе липидов исследованного штамма *L. edodes* 2541 преобладает полиненасыщенная диеновая линолевая ($C_{18:2}$) кислота – 69% от суммы жирных кислот. Среди насыщенных жирных кислот в липидах штамма *L. edodes* 2541 преобладает моноеновая пальмитиновая ($C_{16:0}$) кислота, содержание которой составляет 19% от суммы жирных кислот. В составе липидов штамма *L. edodes* 2541 количество насыщенных жирных кислот (75%) значительно превышает количество насыщенных жирных кислот (24%). В связи с этим степень ненасыщенности липидов составляет 1,46.

Ключевые слова: *Lentinus edodes*, протеины, липиды, жирные кислоты.

Information about the authors:

Mustafin K.G. - University of Power Engineering & Telecommunications, Almaty, Kazakhstan, <https://orcid.org/0000-0001-9471-7333>;

Bisko N.A. - Mycology Department of the Institute of Botany, Kiev, Ukraine;

Kalieva A.K. - Aktobe Regional State University named after K. Zhubanov, Kazakhstan, <https://orcid.org/0000-0003-1178-0236>;

Tapenbayeva I.E. - RPE Co “Antigen”, Almaty, Kazakhstan, <https://orcid.org/0000-0003-0672-5849>;

REFERENCES

- [1] Xin M., et al. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621516300362> - !Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities // Carbohydrate Research. 2016. Vol. 424. P. 30-41.
- [2] Bellini M., et al. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom // Toxicol. *in vitro*. 2013. Vol.17. P.465-469.
- [3] Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: A modern prospective // Crit. Rev.Immunol. 2011. Vol.19. P. 65-96.
- [4] Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal values of the genus *Pleurotus* (Fr) P. Krast // Int. J. Med. Mushrooms. 2010. №1. P.69-70.
- [5] Chang ST. Mushroom biology: the impact on mushroom production and mushroom products. In: Mushroom Biology and Mushroom Products. 2013. P.3-20.
- [6] Himanshi Rathore, Shalinee Prasad Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review // Pharma Nutrition. 2017. Vol.5, № 2. P. 35-46.
- [7] Sandrina A. Heleno, Raíssa Carolina Ferreira. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland // Food Bioscience. 2015. Vol. 11. P. 48-55.
- [8] Nicholas P. Money Are mushrooms medicinal? // Fungal Biology. 2016. Vol. 120, №4. P. 449-453.
- [9] Badalyan S.M., Barkhudaryan A., Rapior S. Recent Progress in Research on the Pharmacological Potential of Mushrooms and Prospects for Their Clinical Application // Medicinal Mushrooms Recent Progress in Research and Development. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019. P.1-71.
- [10] Kapich, A. N. Romanowitz E. S., Voight, S. P. Content and fatty acid composition of the lipids of wood-destroying basidiomycetes // Mikol. andphytopathol. 1990. T. 24, № 1. P. 51-56.
- [11] Feofilova E. P., Gornova I. B., Memorskaya A. S., Garibova L. V. Lipid composition of fruit bodies and mycelium of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] // Microbiology. 1998. T. 67, № 5. P.655-659.
- [12] Vereshchagin A. G., Skvortsov S. V., Iskhakov N. I. Composition of triglycerides of cotton oil // Biochemistry. 1963. T.28, № 5. P.868–878.
- [13] Kates M. Technique of lipidology. M.: The World, 1975. 322 p.
- [14] Feofilova E. P., Gornova I. B., Memorskaya A. S., Garibova L. V. Lipid composition of fruit bodies and mycelium of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] // Microbiology. 1998. T. 67, № 5. P. 655-659.
- [15] Khalafian A.A. (2013) STATISTICA 6. Statistical analysis. 3rd edition. 522 p.