

## ЗАВИСИМОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИЦЕЛИЯ ШАМПИНЬОНА ДВУСПОРОВОГО ОТ БРАССИНОСТЕРОИДОВ

М.А. Заруба, Д.А. Слиж, О.Н. Жук

Полесский государственный университет, [mariazaruba21@gmail.ru](mailto:mariazaruba21@gmail.ru)

**Аннотация.** Проведенные исследования по влиянию 28-гомокастостерона (28-ГК) на накопление биомассы и ферментативную активность мицелия шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus*) показали, что этот фитогормон положительно влияет на рост гриба в глубинной культуре и усиливает образование целлюлолитических ферментов. Такие изменения свидетельствуют о том, что возможно изменение и других ферментативных систем гриба под влиянием разных концентраций брассиностероидов. Данная тематика мало изучена и требует дальнейших исследований. Результаты экспериментов могут стать ценными для различных отраслей биотехнологии: как пищевой, так и лекарственной.

**Ключевые слова:** *Agaricus bisporus*, глубинная культура, 28-гомокастостерон, целлюлолитическая активность.

Грибы являются востребованной продукцией на рынке пищевых продуктов и как источник лекарственных субстанций. Повышение их урожайности и качества при промышленном производстве является актуальной проблемой, решение которой требует расширения рецептур и поиска новых технологий, для получения и качественного посевного материала, и субстратов для выращивания плодовых тел [1].

Наиболее развитым в мировом масштабе является промышленное производство шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus*). Данный гриб имеет в своем составе различные биологически активные субстанции: (на каждые 100 г) белки, усваиваемые на 70–80 % – 3,7 г, жиры – 0,2 г, клетчатка – 0,8 г, фосфор – 10 мг, кальций – 9 мг, железо – 0,6 мг, зольные элементы – 0,8 мг, витамин В<sub>2</sub> – 0,35 мг, а также витамины В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>9</sub>, Е, никотиновая кислота в количестве 49 мг. Разнообразен состав свободных аминокислот: глутаминовая, аспарагиновая, глутамин, серин, глицин, треонин, аланин, валин, фенилаланин, лейцин, а также гомосерин, гомоцистин, β-аминоасляная кислота, α-аминоадипинат, креатин. Гриб активно продуцирует различные ферменты: целлюлазу, супероксиддисмутазу, трипсиназу, мальтазу, протеазу, тирозиназу. Особый интерес в составе представляют мощные антиоксиданты: витамины С и Е, микроэлементы цинк и селен, эргоферин и глутатион [2]. Все эти показатели сделали его привлекательным для потребителей и интересным для исследователей.

Изучение влияния различных природных регуляторов на рост и накопление биологически активных субстанций в плодовых телах гриба и в мицелии глубинной культуры может стать перспективным для дальнейшей разработки биотехнологий его выращивания. Подбор наиболее подходящих биологических стимуляторов позволит получать наибольший прирост биомассы и активное накопление ценных веществ за короткие сроки.

Представляется перспективным применение для этих целей гормонов растительного происхождения – брассиностероидов [3]. Данная группа соединений у растений изменяет мембранный потенциал клеток, активизирует ферментативную активность, синтез белков и нуклеиновых кислот, изменяет содержание в клетках жирных кислот и аминокислот, стимулирует деление и рост клеток в длину. Перечисленные эффекты повышают продуктивность и усиливают рост растений [4].

На сегодняшний день изучено влияние на рост и развитие поверхностной и глубинной культуры *Stereum hirsutum* и Вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*)

фитогормонов – brassinостероидов (24-эпибрасинолида, 24-эпикастерона, 28-гомобрасинолида) [3]. Показано, что введение в глубинные культуры brassinостероидов стимулировало накопление биомассы мицелия, причем степень влияния зависела от конкретного класса соединения.

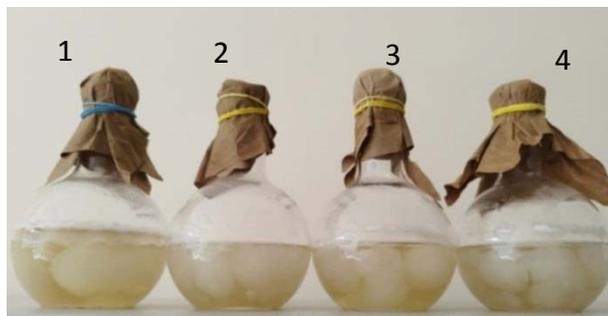
**Целью настоящего исследования** было изучить рост и целлюлолитическую активность *Agaricus bisporus* в глубинной культуре с добавлением фитогормона 28-гомокастерона (28-ГК).

**Материалы и методы исследований.** Глубинное культивирование *A. bisporus* проводили в течение 7 суток на картофельно-сахарозной среде с рН 7,0 при температуре 25 °С. 28-ГК в среду вносили в следующих концентрациях:  $10^{-7}$  М,  $10^{-9}$  М и  $10^{-12}$  М. Культуру гриба высаживали с плотной питательной среды из расчета 1 см<sup>2</sup> мицелия на 100 мл жидкой питательной среды. Для перемешивания культур использовали орбитальный шейкер Wise Shake SHO с режимом работы 70 об./мин.

На 7-е сутки фильтровали культуральную жидкость, измеряли рН сред, Клубочки мицелия с фильтра взвешивали во влажном состоянии. Для приготовления экстракта мицелий гомогенизировали, для этого использовали 1,2 г мицелия и 12 мл 0,9 % раствора NaCl. Гомогенизацию проводили в течение 10 мин при частоте ударов 2,26 раз в секунду на приборе Millmix 20, суспензию помещали на 12 часов в холодильную камеру при температуре от 0 до 2 °С. Следующим этапом было осаждение частиц мицелия центрифугированием в течение 5 минут, при 10000 об./мин и 4 °С. Супернатант отбирали для дальнейших исследований.

Целлюлолитическую активность определяли методом измерения зон просветления вокруг образцов: фрагменты мицелия размером 3×3 мм, выросшего в глубинной культуре с гормоном и без, культуральную жидкость и экстракты мицелия в количестве 10 мкл наносили на плотную среду с Na- карбоксиметилцеллюлозой (Na-КМЦ). После 2 суток культивирования при 26 °С поверхность чашек заливали раствором Люголя для окрашивания Na-КМЦ, выдерживали в течение 5 мин, после чего раствор сливали и озирали зоны просветления.

**Результаты и их обсуждение.** Рост мицелия в виде клубочков был замечен уже на 2-е сутки культивирования во всех исследуемых питательных средах. На 7-е сутки культивирования мицелий представлял собой клубочки разного размера, плотности и структуры, без лучистых отростков. Цвет клубочков мицелия – желто-серый. По мере роста гриба питательная среда осветлялась (рисунок).



**Рисунок – Глубинная культура *A.bisporus* на 7-и сутки культивирования**

(1 – контроль; 2 – с добавлением 28-ГК в  $10^{-7}$  М; 3 – с добавлением 28-ГК в  $10^{-9}$  М; 4 – с добавлением 28-ГК в  $10^{-12}$  М)

Результаты всех измерений и наблюдения по итогам культивирования шампиньона двуспорового представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Сравнительная характеристика глубинной культуры *A.bisporus* на 7 сутки культивирования при добавлении разных концентраций 28-ГК

Концентрация гормонов	Масса мицелия (влажная), г	рН культуральной жидкости	Структура мицелия	Лучистые выросты мицелия	Цвет мицелия
0 (контроль)	30,44±5,31	5,69±0,33	рыхлая	нет	желто-серый
28-ГК $10^{-7}$ М	20,64±0,36↓	5,35±0,40↓	рыхлая	нет	желто-серый
28-ГК $10^{-9}$ М	27,04±9,95↓	4,97±0,26↓	плотная	нет	желто-серый
28-ГК $10^{-12}$ М	32,35±5,36↑	5,73±0,16↑	плотная	нет	желто-серый

Наибольший размер клубочков выявлен в контроле. Самый высокий показатель влажной массы мицелия установлен при добавлении 28-ГК  $10^{-12}$  М. Минимальная масса мицелия получена в образце с 28-ГК  $10^{-7}$  М, что меньше значения в контроле на 9,8 г. Концентрации ГК  $10^{-9}$  М и  $10^{-7}$  М оказали ингибирующее воздействие на рост культуры *A. bisporus*. Стимулирующее воздействие было зафиксировано с 28-ГК  $10^{-12}$  М (показатель превысил контроль на 1,91 г). Во всех образцах за 7 дней культивирования произошел сдвиг рН сред в кислую сторону (с 7,0 стартовой питательной среды до 4,97 среды с 28-ГК  $10^{-9}$  М).

Обнаружена зависимость активности комплекса целлюлолитических ферментов *A. bisporus* от концентрации 28-ГК в среде. Таким типом активности обладали все исследованные объекты (мицелий, культуральная жидкость, экстракты). Интенсивнее всего расщеплял целлюлозу мицелий (таблица 2).

Таблица 2. – Влияние 28-ГК на целлюлолитическую активность *A. bisporus*

Концентрация брасиностероидов, М	Площадь лизиса, мм <sup>2</sup>		
	Мицелий	Экстракт мицелия	Культуральная жидкость
Контроль	391,52±100,25	51,31±16,66	84,17±32,08
28-ГК $10^{-7}$	382,49±66,61↓	56,81±22,17↑	57,47±22,17↓
28-ГК $10^{-9}$	<b>777,15±248,37↑</b>	52,23±33,66↑	81,81±15,47↓
28-ГК $10^{-12}$	<b>531,72±45,60↑</b>	<b>70,29±37,18↑</b>	61,00±22,40↓

Максимальная площадь гидролиза целлюлозы зафиксирована у мицелия, выращенного на питательной среде с 28-ГК  $10^{-9}$  М, у экстракта мицелия – с 28-ГК  $10^{-12}$ , у культуральной жидкости – в контроле. Увеличение способности расщеплять целлюлозу объясняется влиянием гормона на уровень экспрессии и/или активности ферментов *A. bisporus*.

Таким образом, введение в питательную среду 28-ГК приводит к повышению синтеза целлюлолитических ферментов и на этом сроке выращивания они преобладают в мицелии. Требуются дальнейшие наблюдения за развитием таких культур для выяснения степени влияния разных доз 28-ГК на накопление в мицелии и выделение целлюлаз в окружающую среду, в наших экспериментах – в культуральную жидкость.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» на 2021-2025 годы (подпрограмма «Химические основы процессов жизнедеятельности» (Биооргхимия), задание 2.3.3.4).

#### Список использованных источников

1. Александрова Е.Г. Формирование урожайности и качества грибов шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus*) при промышленном культивировании на синтетическом субстрате с применением органических добавок и биопрепаратов: дис. уч. степ. канд. с.-х. наук (06.01.01) / Екатерина Георгиевна Александрова; (ФГБОУ ВО «Самарский государственный аграрный университет». – Кинель, – 2020. – С. 22.
2. Страпко, К.С. Антиоксидантный статус шампиньона двуспорового / К.С. Страпко, Д.А. Слиж, О.Н. Жук // Сборник материалов V международной научно–практической online-offline конференции «Биотехнология: достижения и перспективы развития». – Пинск: ПолесГУ, 2021. – №5. – С. 39 – 42.
3. Слиж Д.А. Рост и развитие глубинной культуры *Stereum hirsutum*: влияние брасиностероидов / Д.А. Слиж, О.Н. Жук // Сборник материалов V международной научно–практической конференции «Биотехнология: достижения и перспективы развития», – Пинск: ПолесГУ, 2021. – С. 37 – 39.
4. Осочук И.М. Влияние брасиностероидов на развитие мицелия вешенки / И.М. Осочук, О.Н. Жук // Сборник материалов II международной научно-практической конференции «Биотехнология: достижения и перспективы развития». – Пинск: ПолесГУ, 2017. – С. 36 – 37.