

European Journal of Biomedical and Life Sciences

Nº 3 2016



«East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH

**Vienna
2016**

European Journal of Biomedical and Life Sciences

Scientific journal
№ 3 2016

ISSN 2310-5674

Editor-in-chief

Todorov Mircho, Bulgaria, Doctor of Medicine

International editorial board

Frolova Tatiana Vladimirovna, Ukraine, Doctor of Medicine

Inoyatova Flora Ilyasovna, Uzbekistan, Doctor of Medicine

Kushaliyev Kaiser Zhalitovich, Kazakhstan, Doctor of Veterinary Medicine

Mihai Maia, Romania, Doctor of Medicine

Nikitina Veronika Vladlenovna, Russia, Doctor of Medicine

Petrova Natalia Gurevna, Russia, Doctor of Medicine

Porta Fabio, Italy, Doctor of Medicine

Sentyabrev Nikolai Nikolaevich, Russia, Doctor of Biological Sciences

Shakhova Irina Aleksandrovna, Uzbekistan, Doctor of Medicine

Skopin Pavel Igorevich, Russia, Doctor of Medicine

Spasennikov Boris Aristarkhovich, Russia, Doctor of Medicine

Suleymanov Suleyman Fayzullaevich, Uzbekistan, Ph.D. of Medicine

Tretyakova Olga Stepanovna, Russia, Doctor of Medicine

Vijaykumar Muley, India, Doctor of Biological Sciences

Zadnipyryany Igor Vladimirovich, Ukraine, Doctor of Medicine

Zhanadilov Shaizinda, Uzbekistan, Doctor of Medicine

Zhdanovich Alexey Igorevich, Ukraine, Doctor of Medicine

Proofreading

Kristin Theissen

Cover design

Andreas Vogel

Additional design

Stephan Friedman

Editorial office

European Science Review

“East West” Association for Advanced Studies
and Higher Education GmbH, Am Gestade 1

1010 Vienna, Austria

Email:

info@ew-a.org

Homepage:

www.ew-a.org

European Journal of Biomedical and Life Sciences is an international, German/English/Russian language, peer-reviewed journal. It is published bimonthly with circulation of 1000 copies.

The decisive criterion for accepting a manuscript for publication is scientific quality. All research articles published in this journal have undergone a rigorous peer review. Based on initial screening by the editors, each paper is anonymized and reviewed by at least two anonymous referees. Recommending the articles for publishing, the reviewers confirm that in their opinion the submitted article contains important or new scientific results.

East West Association GmbH is not responsible for the stylistic content of the article. The responsibility for the stylistic content lies on an author of an article.

Instructions for authors

Full instructions for manuscript preparation and submission can be found through the “East West” Association GmbH home page at: <http://www.ew-a.org>.

Material disclaimer

The opinions expressed in the conference proceedings do not necessarily reflect those of the «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH, the editor, the editorial board, or the organization to which the authors are affiliated.

East West Association GmbH is not responsible for the stylistic content of the article. The responsibility for the stylistic content lies on an author of an article.

© «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH

All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without prior written permission of the Publisher.

Typeset in Berling by Ziegler Buchdruckerei, Linz, Austria.

Printed by «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH, Vienna, Austria on acid-free paper.

Biological Sciences

Section 1. Biotechnology

*Bisko Nina,
Department of Mycology, Institute of Botany,
Lead Researcher, Doctor of Biological Sciences,
Professor Kiev, Ukraine*

*Mustafin Kaira,
Almaty University of Power Engineering &
Telecommunications, Ph.D, Lead Researcher*

*Suleimenova Zhanara,
Department of Biochemistry, LLP Antigen,
Ph.D, Lead researcher
E-mail: msyban@mail.ru*

*Nurlan Akhmetsadykov,
Kazak National Agrarian University,
Professor, Almaty, Kazakhstan*

*Narmuratova Zhanar,
Department of Biochemistry,
LLP Antigen, MSc, Researcher*

Development for the physiologically active inoculum techniques and the study of the kinetic parameters of fungal biomass and biologically active substances synthesis

Abstract: In this paper the optimal time of cultivation of *Ganoderma lucidum* 1621 and *Trametes versicolor* 353 on each stage of preparation of liquid mycelium and the main parameters of the biomass and exopolysaccharides synthesis were investigated. It was found that the biomass of *G. lucidum* 1621 was maximal on the 5th day of growth, and the number of exopolysaccharides — on the 11th day. The highest rate of synthesis of *G. lucidum* 1621 biomass is typical for 3 days of cultivation and biosynthesis of polysaccharides — for the 11th day. The biomass and the number of exopolysaccharides of *T. versicolor* 353 were maximal on the 9th days of growth. Analysis of the kinetic parameters of biomass and exopolysaccharide synthesis shows that the synthesis of cell biomass most actively takes place on the 9th day, and exopolysaccharides — on the 6th day. Energetically most economical is the process of formation of polysaccharides on the third day of growth.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, physiologically active inoculum, polysaccharides, biomass.

*Бисько Ніна,
Отдел микології, Інститут ботаніки,
Ведущий научний співробітник, д. б.н.,
професор Київ, Україна*

*Кайрат Мустафин
Алматынський університет енергетики і зв'язи, к. б.н*

Сулейменова Жанара,
Отдел Биохимии, ТОО Антиген,
главный. научный сотрудник, к. б.н

Ахметсадыков Нурлан,
Казахский Национальный Аграрный Университет,
профессор, д.вет.н. Алматы, Казахстан
E-mail: msyban@mail.ru

Нармуратова Жанар,
Отдел Биохимии, ТОО Антиген,
научный сотрудник, Алматы, Казахстан

Разработка методики получения физиологически активного инокулюма и изучение кинетических параметров синтеза грибной биомассы и биологически активных веществ

Аннотация: В настоящей статье установлены оптимальные сроки выращивания *Ganoderma lucidum* 1621 и *Trametes versicolor* 353 на каждом из этапов подготовки жидкого посевного мицелия и определены основные параметры синтеза биомассы и экзополисахаридов. Установлено, что биомасса *G. lucidum* 1621 достигает максимума на 5-е сутки роста, а количество экзополисахаридов — на 11-е сутки. Наиболее высокая скорость синтеза биомассы штамма *G. lucidum* 1621 характерна для 3-х суток культивирования, биосинтеза полисахаридов — для 11-х суток. Для *T. versicolor* 353 величина биомассы и количество экзополисахаридов достигают максимума на 9-е сутки роста. Анализ кинетических параметров синтеза биомассы и экзополисахаридов показывает, что наиболее активно синтез биомассы клетками *T. versicolor* 353 происходит на 9-е сутки, а экзополисахаридов — на 6-е сутки. Наиболее энергетически экономичным является процесс образования полисахаридов на 3-и сутки роста.

Ключевые слова: физиологически активный инокулюм, полисахариды, биомасса.

Глубинное культивирование базидиальных грибов является наиболее перспективным для получения как биомассы, так и биологически активных веществ [1, 450; 2, 15–32]. При глубинном культивировании создаются благоприятные условия для доступа кислорода и питательных веществ ко всем клеткам мицелия, обеспечиваются благоприятные условия для роста и накопления продуктов метаболизма. В процессе культивирования в жидкой среде между клетками и питательной средой формируется динамичная система прямых и обратных связей. Не только питательная среда влияет на клетку, но и клетка, находясь на разных стадиях своего развития, изменяет свойства питательной среды с помощью своих метаболитов. Кроме того, эта система достаточно чувствительна и к изменению физических параметров среды. В результате, эффективность такой системы плохо поддается прогнозированию и нуждается в постоянном контроле. В связи с этим каждый конкретный случай выращивания культур грибных клеток нуждается в дополнительных ис-

следованиях для оптимизации процесса получения биологически активных соединений.

Помимо физических и химических параметров процесса культивирования большое значение имеет физиологическая зрелость исходного материала веществ [3, 135–163; 4, 590–595; 5, 369–378; 6, 671]. Биологический инокулюм в процессе подготовки к масштабному культивированию должен пройти несколько этапов выращивания на твердых и жидких средах, в ходе которых его объем постепенно увеличивается. Самая большая опасность при этом — возможность потери культурой своей физиологической активности, старение культуры. Поэтому начальным этапом любой биотехнологии является разработка метода получения в достаточных количествах физиологически молодой культуры клеток для инокулюма. Целью настоящего исследования являлось разработка методики получения физиологически активного инокулюма и изучение кинетических параметров синтеза грибной биомассы и биологически активных веществ в глубинных условиях роста.

Грибы рода *Ganoderma*

В отличие от бактерий, дрожжей и микромицетов, где посев может быть проведен определенным количеством клеток или конидий, стандартизировать инокулюм лекарственного базидиального макромицета *Ganoderma lucidum*, образующего плотные мицелиальные пленки на поверхности жидких питательных сред или агломераты мицелия в глубинной культуре, невозможно без применения специально разработанных приемов. Указанные особенности ограничивали возможность применения методов «острых опытов» для исследования физиологии питания и кинетики роста *G. lucidum* в периодическом процессе с учетом необходимых требований постановки таких экспериментов. На основе про-

веденных исследований нами разработан комплекс методических приемов, обеспечивающий необходимые условия для получения хорошо воспроизводимых количественных данных при работе с вегетативными культурами *G. lucidum*. Разработана методическая схема получения физиологически активного посевного мицелия, которая включает ряд последовательных этапов подготовки инокулюма, в том числе, и выращивание глубинного мицелия в колбах на качалке при стандартном соотношении жидкой и газообразной фаз (1: 10) и измельчение агломератов глубинного мицелия в гомогенизаторе при режимах, обеспечивающих получение суспензии состоящей на 80% из обрывков гиф размером 0,1–0,2 мм (рисунок 1).

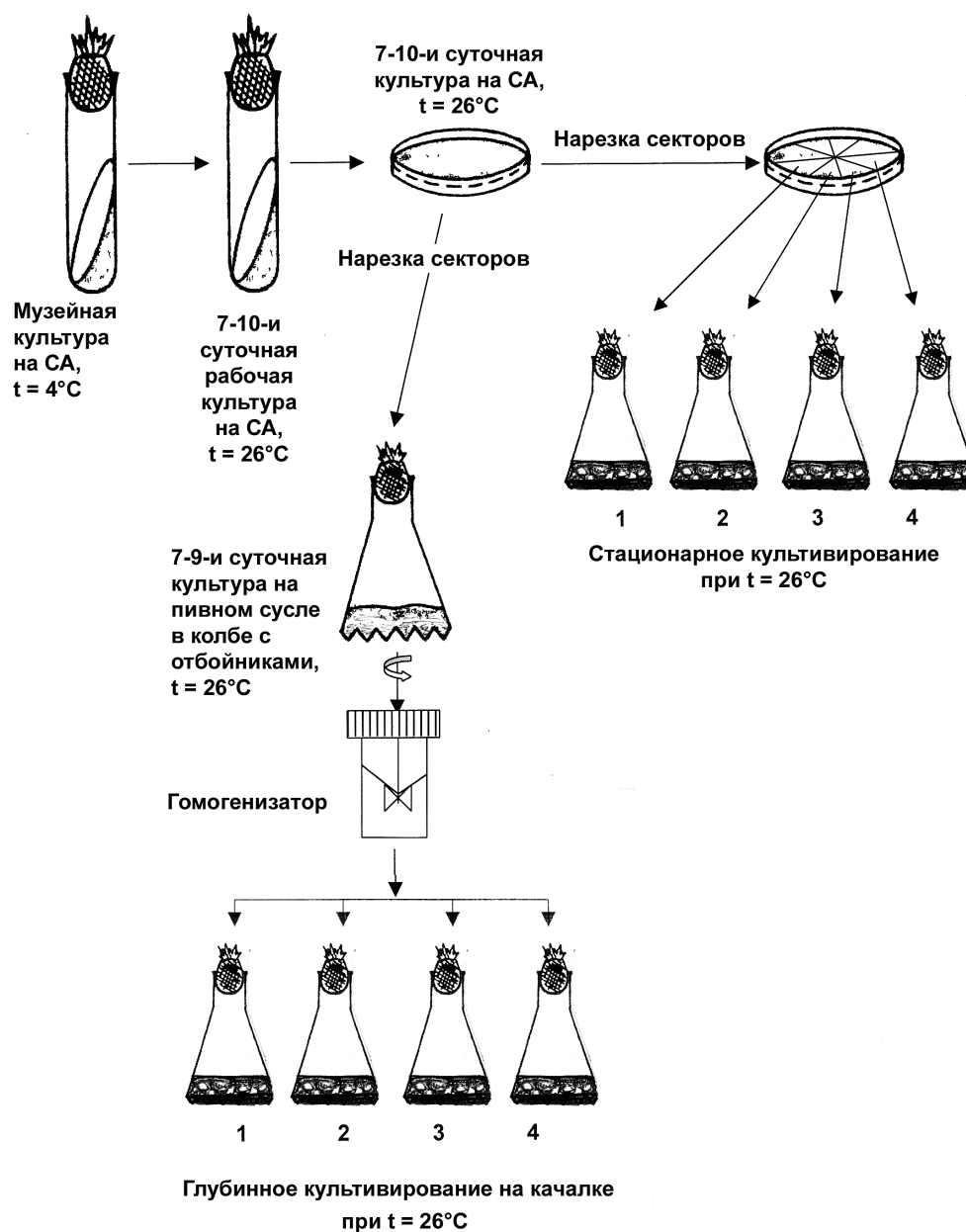


Рисунок 1. Основные этапы методологической схемы получения физиологически активного жидкого инокулюма *Ganoderma lucidum* 1621

Концентрация биомассы после инокуляции опытных питательных сред обычно составляла 1,6–1,8 г/л по абсолютно сухому веществу при 105 °С (а. с. в.). При исследовании питательных потребностей подготовка инокулюма включала этап промывки и голодание мицелия в течение 2 недель в дистиллированной воде при 4 °С для исчерпания запаса эндогенного субстрата. Штамм *G. lucidum* 1621 отличается способностью в условиях глубинной культуры быстро накапливать биомассу до концентрации более 16 г/л, использовать дешевые и недефицитные источники питания, а также различные комплексные среды, пригодные для культивирования мицелия пищевого назначения. Более того, он характеризуется четкими морфологическими признаками в культуре. Исследования физиологических особенностей штамма *G. lucidum* 1621 проводились с целью определения условий глубинного культивирования, которые способствуют быстрому росту, продуктивности, накоплению ценных продуктов метаболизма в культуральной жидкости и более полному выявлению потенциальных возможностей культуры *G. lucidum* 1621.

Полученные данные по динамике накопления биомассы и экзополисахаридов *G. lucidum* 1621 на глю-

козо-пептон-дрожжевой (ГПД) питательной среде подчинялись общим закономерностям развития микроорганизмов в условиях периодической культуры. Выявлены также определенные различия, которые выражались в длительности фаз роста и синхронности динамики роста культуры, образования экзополисахаридов (рисунок 2).

Значительное влияние на рост *G. lucidum* 1621 в глубинной культуре оказывает качество мицелиального инокулюма, в частности, его возраст, дисперсность, способ культивирования. Установлено, что скорость роста при глубинном культивировании штамма *G. lucidum* 1621 изменялась в зависимости от того, в поверхностной или глубинной культуре выращивали посевной мицелий. Когда инокуляция проводилась поверхностным мицелием, лаг фаза составляла 10–12 ч, тогда как в качестве инокулюма использовали глубинный мицелий, находящийся в момент посева в экспоненциальной фазе роста, лаг фаза длилась 2–3 ч, после чего кривые роста начинали подниматься вверх (рисунок 2.). Количество мицелиальной массы продолжало увеличиваться на протяжении 5 суток, что соответствует фазе активного роста культуры.

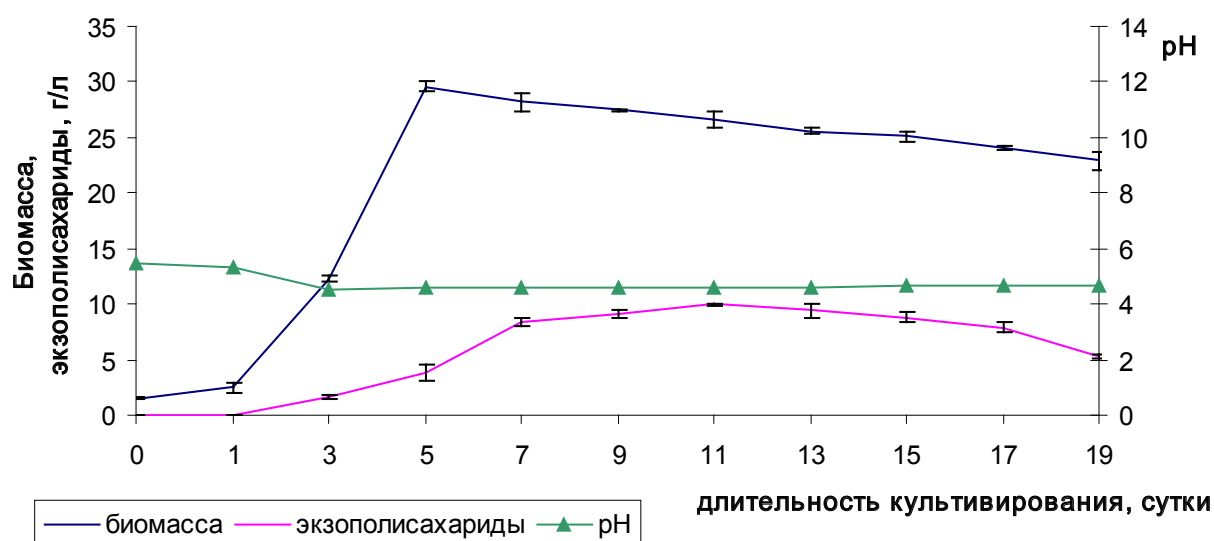


Рисунок 2. Динамика роста, синтеза экзополисахаридов и pH среды при культивировании штамма *G. lucidum* 1621 на ГПД

На ГПД питательной среде средняя скорость накопления биомассы в активной фазе роста штамма *G. lucidum* 1621 составила 5,6 г/л/сутки, что значительно выше, чем данные, опубликованные в литературе. Как следует из рисунка 2 типичная стационарная фаза роста, когда рост отдельных клеток еще про-

должается, но процесс размножения уравновешивается процессом гибели клеток, длилась 2-е суток и начиналась у *G. lucidum* 1621 уже на 5-е сутки эксперимента. Установлено, что количество экзополисахаридов увеличивалось до 11-х суток культивирования (таблица 1).

Таблица 1 – Кинетические параметры биосинтеза биомассы и экзополисахаридов штамма *G. lucidum 1621* при оптимальных условиях культивирования на жидкой ГПД среде

Кинетические параметры	Время культивирования, сутки				
	3	5	7	9	11
Скорость образования экзополисахаридов, г/л/сут	1	1	2	1	0,7
Удельная скорость образования экзополисахаридов, сут ⁻¹	0,06	0,1	1	1,25	1,5
Продуктивность процесса биосинтеза экзополисахаридов, г/л/сут	0,07	0,08	0,14	0,16	0,19
Удельная скорость биосинтеза биомассы, сут ⁻¹	0,54	0,42	0,05	0,05	–

Таким образом, на основании проведенных комплексных исследований установлены оптимальные сроки выращивания культуры на каждом из этапов подготовки жидкого посевного мицелия и определены основные параметры синтеза биомассы и экзополисахаридов для отобранного в результате скрининга штамма ценного лекарственного гриба *G. lucidum 1621*. Доказано, что биомасса достигает максимума на 5-е сутки роста, а экзополисахариды — на 11-е сутки. Наиболее высокая скорость синтеза биомассы *G. lucidum 1621* характерна для 3-х суток культивирования, биосинтеза полисахаридов — для 11-х суток. Продуктивность синтеза экзополисахаридов в расчете на количество синтезированной биомассы наиболее высокая на 11-е сутки роста, в то же время величина абсолютной скорости синтеза экзополисахаридов *G. lucidum 1621* достигает максимума на 7-е сутки культивирования.

Грибы рода *Trametes*

Грибы рода *Trametes* обладают высокой для базидиальных грибов скоростью роста в условиях глубинного культивирования. При глубинном куль-

тивировании создаются благоприятные условия для доступа кислорода и питательных веществ ко всем клеткам мицелия, обеспечиваются благоприятные условия для роста и накопления продуктов метаболизма. В подавляющем большинстве случаев при глубинном культивировании базидиальных грибов рост мицелия происходит в виде пеллет — сферических скоплений мицелия. В отличие от бактерий, дрожжей и микромицетов, где посев может быть проведен определенным количеством клеток или конидий стандартизировать инокулюм лекарственного базидиального макромицета *Trametes versicolor*, образующего плотные мицелиальные пленки на поверхности жидких питательных сред или агломераты мицелия в глубинной культуре невозможно без применения специально разработанных приемов. В нашей работе мы применили общий методический подход, состоящий в использовании на каждом этапе исследования культуры в наиболее активном физиологическом состоянии. Нами были установлены оптимальные сроки выращивания культуры на каждом из этапов подготовки жидкого посевного материала (рисунок 3).

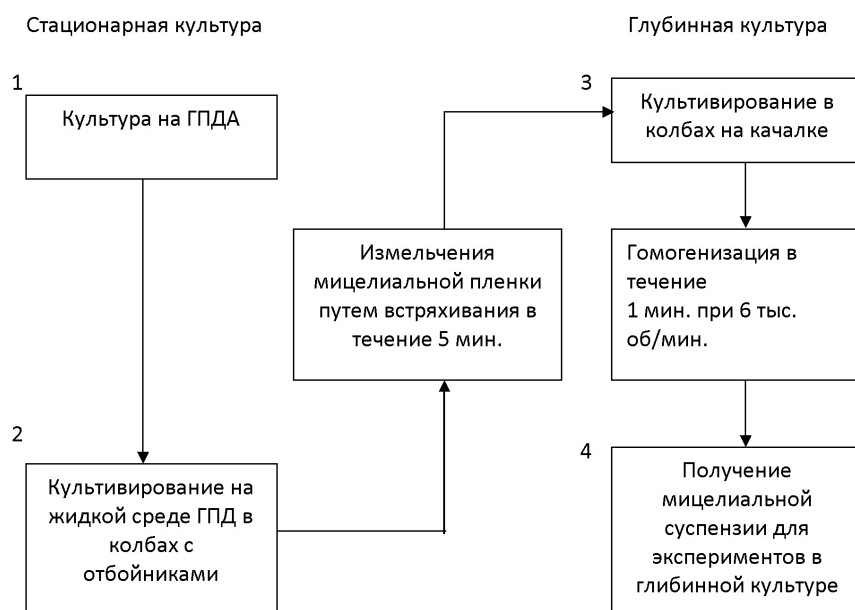


Рисунок 3 — Этапы получения физиологически активного жидкого инокулюма штамма *Trametes versicolor 353*

Музейные культуры пересеивались на рабочие косяки с ГПДА, которые выращивали в термостате при 28–30° в течение 10–12 суток. Жидкую глюкозо-пептон-дрожжевую среду (ГПД) разливали по 50 мл в 250 мл колбы с отбойниками (специальные выступы длиной 1–1,5 см на дне и нижней боковой части колб), засеивали мицелием с кусочками агара и инкубировали в течение 12–14 суток до образования мицелиальной пленки на поверхности среды. Затем мицелий измельчали, встряхивая колбы в течение 4–5 минут и полученной суспензией инокулировали жидкие питательные среды, внося 10% от объема среды. Посевы инкубировали при оптимальной температуре на шейкере.

Известно, что при культивировании на жидкой среде базидиомицеты рода *Trametes* выделяют экзополисахариды.

Грибные экзополисахариды макромицетов в последние годы вызывают большой интерес в связи с тем, что многие из них обладают антибластомной активностью. Их действие проявляется опосредованно, через иммунную систему. Лечебные средства на основе грибных гликанов уже созданы и используются в странах Востока. Более того, они используются в качестве гепатопротекторных, иммуномодуляторных и других лечебных средств. Величина биомассы и экзополисахаридов культур может значительно варьировать в зависимости от условий постановки, проведения экспериментов и биологических особенностей штаммов грибов. В наших условиях проведения опыта наблюдалась синхронность динамики роста и образования экзополисахаридов (рисунок 4, таблица 2).

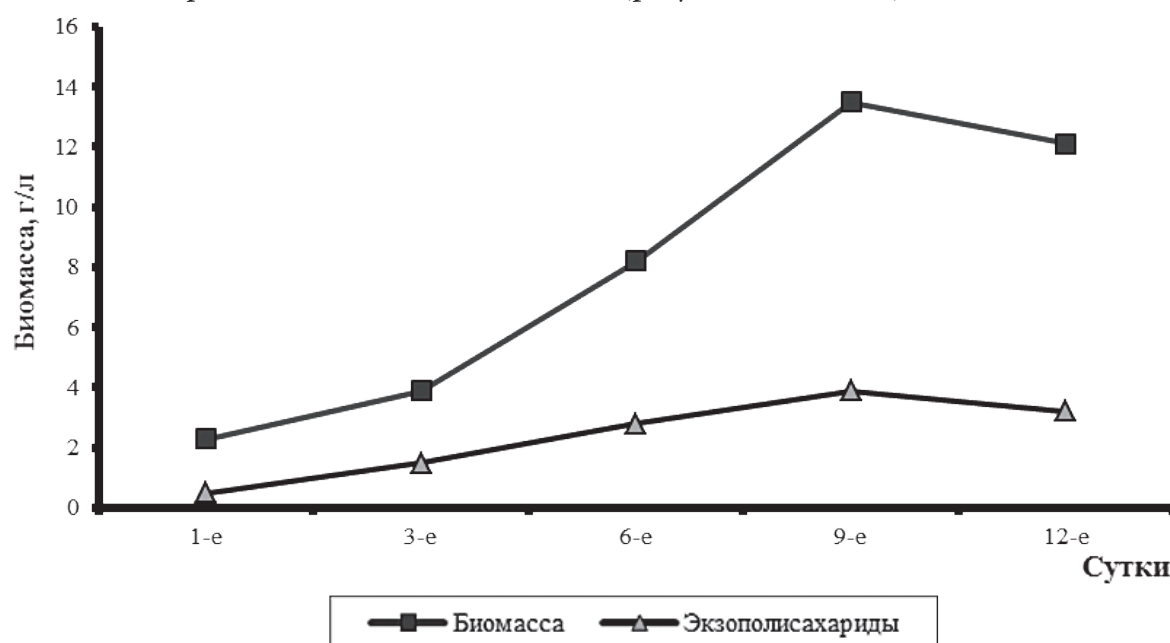


Рисунок 4. Динамика биомассы и синтеза экзополисахаридов штамма *Trametes versicolor* 353 при культивировании на жидкой оптимизированной ГПД среде

Таблица 2. – Кинетические параметры биосинтеза биомассы и экзополисахаридов штамма *Trametes versicolor* 353 при оптимальных условиях культивирования на жидкой ГПД среде

Кинетические параметры	Время культивирования, сутки		
	3	6	9
Скорость образования экзополисахаридов, г/л/сут.	0,33	0,47	0,37
Удельная скорость образования экзополисахаридов, сут. ⁻¹	0,31	0,1	0,07
Продуктивность процесса биосинтеза экзополисахаридов, г/л/сут.	0,19	0,11	0,1
Удельная скорость биосинтеза биомассы, сут. ⁻¹	0,15	0,2	0,51

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что, для штамма *T. versicolor* 353 на оптимизированной среде характерна синхронность процессов биосинтеза биомассы и биологически активных веществ — экзополисахаридов. В условиях глубинного культивирования величина

биомассы и количество экзополисахаридов достигают максимума на 9-е сутки роста. Анализ кинетических параметров синтеза биомассы и экзополисахаридов показывает, что наиболее активно синтез биомассы клетками *T. versicolor* 353 происходит на 9-е сутки, а экзополисахаридов — на 6-е сутки. Наиболее

энергетически экономичным является процесс образования полисахаридов на 3-и сутки роста.

Acknowledgements: This research work was funded by Ministry of Education and Sciences of the

Republic of Kazakhstan. Grant № 1366 “Production of biologically active food supplements with therapeutic-prophylactic properties from *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*”.

Список литературы:

1. Chang S. T., Miles P. G. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. London; New York; Washington: CRC Press, 2004. 450 p.
2. Boh B., Berovič M., Wraber B. et al. *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd and *G. applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllorphomycetidae) from Slovenian habitats: cultivation, isolation, and testing of active compounds.//International Journal of Medicinal Mushrooms. 2004. 6, – № 1. P. 15–32.
3. Бисько Н. А., Бабицкая В. Г., Митропольская Н. Ю. Медико-биологические исследования некоторых видов съедобных и лекарственных грибов//Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре: Сб. научных трудов в 2 томах – Киев: Альтепрес. – 2011. – С. 135–163.
4. Круподерова Т. А., Бисько Н. А., Поединок Н. Л., Васильева Б. Ф., Ефременко О. В. Антимикробная активность штаммов *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat. и *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. в условиях глубинного культивирования.//Украинский ботанический журнал – 2008. – Т. 65. – № 4. С. 590–595.
5. Poedynok N. L., Buchalo A. S., Mykchaylova O. B., Negriyko A. M. Light Regulation of Growth and Biosynthetic Activity of *Ling Zhi* or *Reishi* of Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. in Pure Culture//International J. Med. Mushrooms. – 2008. – Vol.10. – № 4. – P. 369–378.
6. Бухало А. С., Бабицкая В. Г., Бисько Н. А., и др. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Сб. научных трудов. в 2-х томах. Киев. – 2012. – 671 с.