

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ МІЖФАЗНОЇ ТЕНЗІОМЕТРІЇ ТА РЕОМЕТРІЇ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ КСИЛОТРОФНИХ БАЗИДІОМІЦЕТІВ

О. В. Чайка¹

О. В. Федотов¹

В. Б. Файнерман²

С. В. Лилик²

¹Донецький національний університет, Україна

²Донецький національний медичний університет, Україна

E-mail: bio.graff@yandex.ua

Отримано 01.02.2013

Досліджено тензіореометричні характеристики фільтрату культуральної рідини глибинних культур 63 штамів 19 видів базидіоміцетів методом аналізу форми вісесиметричних висячих крапель. Метод має необхідну високу чутливість під час роботи з мікологічним матеріалом. Встановлено високий ступінь залежності показників міжфазної тензіометрії та реометрії від видової належності культури, на підставі чого запропоновано використовувати цей комплекс тензіореометричних параметрів для систематичної ідентифікації культур і як критерій відбору штамів-продуцентів біосурфактантів. Виявлено кореляційні зв'язки тензіореометричних характеристик фільтрату культуральної рідини як між собою, так і з показниками росту й інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів культур. Це дає змогу отримати інтегральний показник, що відображає стан метаболічних процесів глибинної культури. За результатами дослідження відібрано штами базидіоміцетів — потенційні продуценти біосурфактантів, що мають високу швидкість росту та інтенсивність ліпідної пероксидації для використання в біотехнологічному виробництві.

Ключові слова: ксилотрофні базидіоміцети, глибинне культивування, міжфазна тензіометрія, реометрія, пероксидне окиснення ліпідів.

Ксилотрофні базидіоміцети на сьогодні розглядають як потенційні продуценти численних біологічно активних речовин (БАР), які можуть набути широкого застосування в різних галузях промисловості, сільського господарства та медицини [1–3]. У сучасній біотехнології для отримання низки БАР із грибів найперспективнішою вважають технологію глибинного культивування, в якій дотримуються принципу безвідходного використання міцелію і культуральної рідини [1, 4]. Глибинний міцелій за вмістом найважливіших БАР не поступається плодовим тілам, а за накопиченням протеїнів, ліпідів, полісахаридів і каротиноїдів перевершує їх [1, 5, 6–8]. Технологія глибинного культивування повністю забезпечує однакові контрольовані умови, що сприяють максимальному росту міцелію і накопиченню продуктів метаболізму. У результаті можна одержувати однорідну стандартизовану продукцію високої якості із заданими властивостями, що гарантує ефективність і безпеку препаратів цільового призначення [1, 4, 9–11].

До складу рідких живильних середовищ можуть входити різноманітні поверхнево-активні речовини (ПАР), які здатні адсорбуватися на рідких межах розділу фаз і змінювати поверхневий (міжфазний) натяг (ПН). Вважають [12, 13], що величина ПН рідини, де розвивається глибинна культура гриба, є надзвичайно важливою характеристикою і впливає на найважливіші процеси життєдіяльності культури, зокрема на живлення, розвиток і розмноження. Під час росту гриби поглинають поживні компоненти середовища і виділяють різноманітні екзо-метаболіти, змінюючи тим самим склад, кількість та співвідношення різних компонентів, у т. ч. ПАР. Окрім того, вони можуть цілеспрямовано змінювати ПН культуральної рідини завдяки утворенню ПАР: протеїнів (гідрофобінів), екзополісахаридів, жирних кислот тощо [13–15]. Однак культури грибів, як показують дослідження, ще практично не вивчено методом тензіореометрії. Отже, культуральна рідина глибинних культур грибів є важливою моделлю для

вивчення міжфазної тензіометрії та реометрії.

Дереворуйнівним базидіоміцетам притаманні унікальні неспецифічні механізми розщеплення хімічно стійкого лігніноцелюлозного комплексу деревини. Вільнорадикальні ланцюгові реакції, спрямовані на руйнування лігніну, залежать від генерації активованих форм кисню (АФК), зокрема, ліпопероксидних радикалів [16–20]. Ці реакції мають неспецифічний характер, тому існує можливість залучення ксилотрофних базидіоміцетів до технологій деструкції лігніноцелюлозних відходів, ксенобіотиків та біоремедіації забруднених середовищ [2, 19, 21–24]. Однак багато вуглеводнів, що використовуються мікроорганізмами-деструкторами як джерела енергії та вуглецю, мають низьку розчинність у воді. Це підвищує їх незворотну адсорбцію до поверхонь і обмежує доступність мікроорганізмам, що ускладнює деструкцію [25, 26]. ПАР біологічного походження (біоПАР) здатні десорбувати з поверхонь та збільшувати водну розчинність і, таким чином, підвищувати біодоступність слабозчинних органічних сполук, таких як поліциклічні ароматичні вуглеводні. Це істотно прискорює біоремедіацію забрудненого середовища [27].

На цей час інтерес до біоПАР значно зріс завдяки тому, що за здатністю до емульгування вони не поступаються синтетичним, але, на відміну від останніх, мають низьку перевагу. Вони є біодеградабельними, не токсичними, стійкими в широкому діапазоні температур, рН і солоності середовища, їх можна одержувати з відновлювальних джерел завдяки мікробній ферментації [28, 29]. Використання біоПАР можливо в нафтовидобувній і гірничодобувній, фармацевтичній, хімічній та харчовій галузях промисловості, сільському господарстві, біотехнології та екології [1, 30–32].

Метою роботи було вивчення можливості розширення застосування тензіометричних методів у біотехнології мікологічних об'єктів, дослідження тензіореометричних параметрів культуральної рідини глибинних культур базидіоміцетів і пошук потенційних штамів-продуцентів біосурфактантів, яким притаманна висока швидкість росту й інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були глибинний міцелій та культуральна рідина 63 штамів 19 видів ксилотрофів із колекції культур

базидіоміцетів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету [33].

Серед досліджених штамів 44 належать до порядку *Agaricales: Agarocybe cylindracea* (DC.) Maire — 167, 218, 960; *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler — Le-2, Le-340, Le-4, Le-6, Le-7; *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer — F-03, F-06, F-073, F-1, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-610, F-vv, F-10, F-11, F-1105; *Fistulina hepatica* (Schaeff.) With. — Fh-08, Fh-09, Fh-18; *Schizophyllum commune* Fr. — Sc-10 Sc-1102 Sc-1104; *Pleurotus citrinopileatus* Singer — P-citr; *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. — P-er; *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. — D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-94, P-107, P-210; *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. — AX, MS-3; 19 штамів — до порядку *Polyporales: Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. — Gl-1, Gl-2, Gl-3, Gl-B-1-11; *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. — IL-4K, IL-1, IL-1201; *Fomes fomentarius* (L.) Fr. — Ff-09, T-10, Ff-1201; *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd — Th-11; *Trametes ochracea* (Pers.) Gilb. & Ryvarden — To; *Trametes trogii* Berk. — Tt-11; *Trichaptum bifforme* (Fr.) Ryvarden — Tb-11; *Daedalea quercina* (L.) Pers. — Dq-08; *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray — Gf-01; *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill — Ls-08, Ls-09.

Більшість штамів (78%) було виділено в чисту культуру з дикорослих базидіом [33, 34], зібраних у різних районах м. Донецька та області. Крім того, для досліджень отримано 5 штамів з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (ІБК): *A. cylindracea* 167, 218, 960, *L. edodes* Le-340, *F. velutipes* F-610; 7 штамів — з комерційних організацій «УкрМіцелій» і «Біотехнологія»: *L. edodes* Le-2, Le-4, Le-6, Le-7, *P. citrinopileatus* P-citr, *P. eryngii* P-er, *P. ostreatus* Hk-35. Чисті міцеліальні культури підтримуються на агаризованому незахміленому пивному суслі (4° за Баллінгом) за температури $+6 \pm 2$ °C.

Штами культивували глибинним методом на лабораторній качалці АБУ-6С (Росія) на глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) такого складу (г/л): пептон (Biofac, Данія) — 3,0; глюкоза — 10,0; K_2HPO_4 — 0,6; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,001 (усі компоненти кваліфікації ч. д. а. та х. ч.). Співвідношення С:N в ГПС 13:1, рН середовища після стерилізації $6,62 \pm 0,06$. Культивування проводили при 25 ± 1 °C — температурному оптимумі росту більшості штамів [35]. Інокулюмом слугував гомогенізований глибинний міцелій, який вирощували в аналогічних умовах у колбах з шипоподібними

відбійниками протягом 7 діб. Перед пересівом визначали абсолютно суху біомасу, а також встановлювали відсутність контамінації інокулюма за допомогою світлового мікроскопа XS-5520 MICROMed (Китай). Інокулюм вносили в кількості 10% за об'ємом середовища. Термін культивування більшості штамів — 6 діб, а для трьох штамів (*G. frondosa* Gf-01, *L. sulphureus* Ls-08 і Ls-09) — удвічі більший через повільну швидкість росту міцелію.

Наприкінці ферментації міцелій відділяли від культуральної рідини за допомогою щільної капронової тканини, отримуючи фільтрат культуральної рідини (КФ). Водневий показник КФ знаходили потенціометричним методом на рН-метрі рН-150 МИ (Росія). Міцелій тричі промивали дистильованою водою, підсушували фільтрувальним папером. Визначали абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію ваговим методом [35] і розраховували приріст біомаси.

Тензіореометричні параметри фільтрату культуральної рідини встановлювали модифікованим методом аналізу форми вісесиметричних висячих крапель за допомогою тензіореометра PAT-2 (SINTERFACE Technologies, Німеччина) [36–38]. Для аналізу брали до 0,5 мл КФ. Час аналізу профілю краплі, необхідний для досягнення рівноваги, визначали експериментально — 2 000–3 000 с. Графік залежності динамічного поверхневого натягу для КФ, отриманого після 6-добового глибинного культивування штаму *Trametes trogii* Tt-11, і вихідного ГПС від часу до початку стресового розширення краплі подано на рис. 1.

На динамічних тензіограмах визначали такі параметри [36, 39, 40]: коефіцієнт рівноважного поверхневого натягу (σ_4) як граничний поверхневий натяг залежно від $t^{-1/2}$, кут нахилу тензіограми в координатах $t^{-1/2}$ (λ_2), модуль в'язкопружності в стресовому

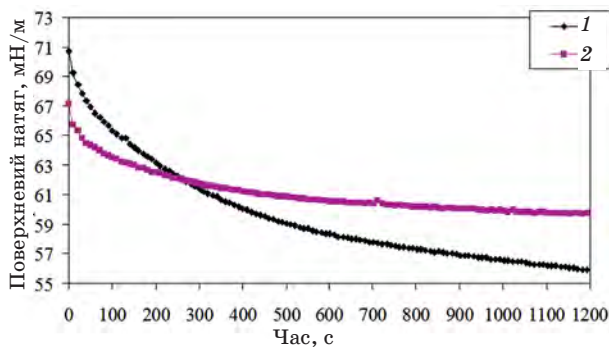


Рис. 1. Залежність динамічного поверхневого натягу КФ: культури *T. trogii* Tt-11 (1) та ГПС (2) від часу

експерименті (E) за розширення поверхні краплі на 7% і час релаксації поверхневого натягу після розширення краплі (τ). Експериментальна похибка вимірювань поверхневого натягу становила близько 0,1 мН/м.

Для дослідження дилатаційної в'язкопружності після досягнення рівноважного поверхневого натягу поверхню краплі піддавали гармонічним осциляціям із частотою f від 0,005 до 0,2 Гц (або від 0,031 до 1,256 рад/с). Амплітуда осциляції площі краплі становила 7–10% [40, 41]. На рис. 2 показано гармонічні осциляції площі краплі з частотою 0,02 Гц (темні пункти) і відповідні коливання поверхневого натягу (світлі пункти) культурального фільтрату штаму *T. trogii* Tt-11. Стрілками позначено фазовий зсув (кут φ) між амплітудами коливань цих параметрів. Видно, що амплітудне значення поверхневого натягу відстає від амплітуди коливань площі на кут φ .

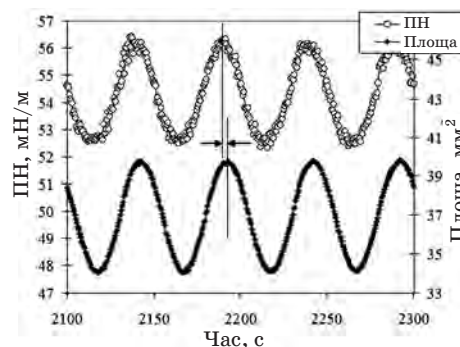


Рис. 2. Гармонічні осциляції площі краплі та поверхневого натягу КФ *T. trogii* Tt-11

Результати експериментів із гармонічними осциляціями аналізували за допомогою швидкого перетворення Фур'є у пакеті програмного забезпечення Oscibubble_1.9.exe. Комплексний модуль в'язкопружності E_c за гармонічних осциляцій враховує всі релаксаційні процеси, які впливають на коефіцієнт поверхневого натягу. Модуль E_c обчислювали за формулою [40]:

$$E_c = A_0 \frac{\Delta\gamma}{\Delta A},$$

де A_0 — площа поверхні краплі, ΔA та $\Delta\gamma$ — амплітуди зміни площі краплі та поверхневого натягу при осциляції.

Модуль в'язкопружності E_c включає в себе модуль пружності, що відображає накопичення енергії в поверхневому шарі (реальна компонента — E_r), і модуль втрат, який відображає втрати енергії в релакса-

ційних процесах (уявна компонента — E_i): $E_c = E_r + iE_i$. За допомогою перетворення Фур'є розраховували внески від модуля пружності та в'язкості в модуль в'язкопружності E_c і фазовий кут між деформацією і напругою.

Компоненти E_r і E_i подано на графіках (рис. 3) у вигляді залежності від логарифма кутової частоти осциляцій ω . Для всіх досліджених систем ця залежність має практично лінійний характер і виражається рівняннями:

$$E_r = a_1 + b_1 \cdot \lg \omega, E_i = a_2 + b_2 \cdot \lg \omega,$$

де ω — кутова частота осциляцій, $\omega = 2\pi f$ рад/с; f — частота осциляцій, Гц; a_1 — вільний член лінійного рівняння для E_r або поверхнева пружність за частоти 1 рад/с (за цієї частоти другий член рівняння обертається на нуль); b_1 — кут нахилу лінійної залежності E_r від ω ; a_2 — вільний член лінійного рівняння для уявної компоненти в'язкопружності E_i за частоти 1 рад/с. Оскільки поверхнева в'язкість $\mu = E_i/\omega$, то за частоти $\omega = 1$ рад/с значення μ і E_i рівні між собою і тому a_2 є значенням поверхневої в'язкості μ за частоти 1 рад/с; b_2 — кут нахилу лінійної залежності уявної компоненти в'язкопружності E_i від логарифма частоти осциляцій [36, 39, 40].

Значення реальної та уявної складових модуля в'язкопружності надзвичайно чутливі до вмісту ПАР. Це вказує на дуже високу чутливість цього методу дослідження культуральних рідин базидіоміцетів.

Оцінювання інтенсивності процесів ПОЛ у міцелії та КФ здійснювали модифікованим методом за вмістом його продуктів, актив-

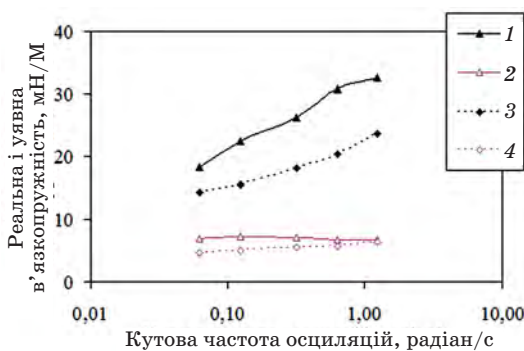


Рис. 3. Залежність реальної (модуль пружності, крива 1) та уявної (крива 2) складових комплексної в'язкопружності культурального фільтрату штаму *T. trogii* Tt-11, а також модуля пружності (крива 3) і уявної компоненти (крива 4) вихідного ГПС від частоти гармонічних осциляцій поверхні краплі ω з амплітудою $\pm 7\%$

них до тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП). Принцип методу полягає в тому, що за нагрівання в кислому середовищі частина продуктів ПОЛ, які належать до класу гідропероксидів, розкладається з утворенням малонового діальдегіду (МДА), взаємодія якого з ТБК зумовлює утворення забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання за 532 нм.

Розрахунок вмісту ТБК-АП (A) проводили за формулою:

$$A = \frac{(E_{532} - E_{590}) \cdot 10^6 \cdot V \cdot K}{1,56 \cdot 10^5 \cdot P},$$

де E_{532} та E_{590} — показники екстинкції дослідної проби за 532 і 590 нм; 10^6 — фактор розмірностей; V — об'єм реакційної суміші (мл); K — коефіцієнт перерахунку на абсолютно суху масу міцелію (для КФ не враховується); $1,56 \cdot 10^5$ — молярний коефіцієнт екстинкції; P — кількість матеріалу — сирого міцелію (г) або КФ (мл). Вміст ТБК-АП виражали в нмоль/г (мл).

Дослідження проводили триразово. Отримані дані обробляли з використанням *Microsoft Excel* та пакета програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів [43].

Результати та обговорення

Під час ферментації на ГПС досліджувані штами утворювали пелети (*pellets*) — стабільні більш або менш щільні сферичні агрегати, що складаються з розгалужених переплетених гіф (рис. 4). В одних штамів поверхня пелетів була гладкою, в інших наявні радіально розташовані міцеліальні тяжі.

Розміри пелетів у різних культур відрізнялися. Так, невеликі пелети діаметром до 3 мм були характерні для штамів таких видів базидіоміцетів: *L. edodes*, *P. citrinopileatus*, *G. lucidum*, *I. lacteus*, *G. frondosa*,

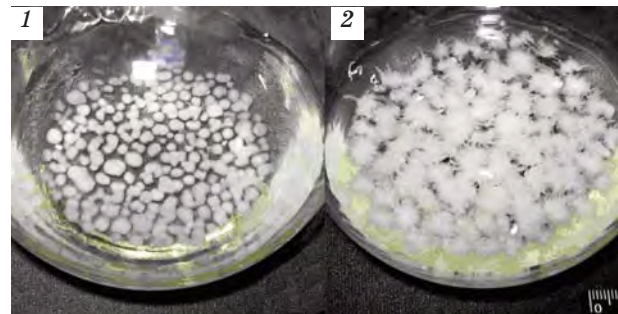


Рис. 4. Глибинні 6-добові культури штамів *P. eryngii* P-er (1) та *T. hirsuta* Th-11 (2)

L. sulphureus. Більші (4–7 мм) — для *A. cylindracea*, *F. hepatica*, *S. commune*, *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *F. fomentarius*, *D. quercina*, *T. hirsuta*, *T. ochracea*, *T. trogii*, *T. biforme*, *P. ostreatus*, *F. velutipes*, проте низка штамів останніх двох видів утворювали дрібніші пелети. Вони були переважно білого кольору, часто з жовтуватим відтінком, і тільки у двох видів — забарвлені: *F. hepatica* — жовтувато-зелені, а *F. fomentarius* — золотисто-жовті. Штами цих двох видів так само забарвлювали КФ у відповідний відтінок. Такий колір пов'язаний з інтенсивним синтезом цими культурами поліфенолів і каротиноїдів, що нами було встановлено в результаті додаткових досліджень [33, 44]. Крім пелетів, у деяких випадках в незначній кількості траплялися також вільні філаменти і невеликі шматочки міцелію неправильної форми.

Після відокремлення міцеліальних утворень КФ штампів піддавали тензіореометричним тестам. На рис. 5 наведено значення модуля в'язкопружності в стресовому експерименті E (1) і поверхневої пружності за частоти 1 рад/с a_1 (2) КФ досліджуваних штамів порівняно з вихідним ГПС (контроль). Як видно, порівнювані показники залежать від видової належності культури. Був розрахований коефіцієнт кореляції (r) для цих показників, який становив $0,96 \pm 0,01$. Із цього випливає, що реальна частина складає значну частку комплексної в'язкопружності.

Для більшості досліджуваних штамів є характерним достовірне збільшення значень E КФ порівняно із цим показником для вихідної ГПС. Це штами родів *Pleurotus* і *Trametes*, а також видів *A. cylindracea*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *L. sulphureus*. Для

представників порядку *Agaricales* характерні вищі значення E порівняно з культурами порядку *Polyporales*. Найбільші значення E отримано для штамів F-102, F-610 *F. velutipes* і MS-3 *P. pulmonarius*, які перевищують контроль більш ніж у 4 рази.

Штами видів *S. commune*, *D. quercina* і штамп *I. lacteus* IL-1201 вірогідно знижують рівень E . Найменше значення E в останнього штаму нижче контролю в 2,1 рази.

Значення a_1 , які достовірно вище контролю, встановлено для штамів видів *A. cylindracea*, *F. velutipes*, *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *T. trogii*, *L. sulphureus* і більшості штамів *P. ostreatus*. Найвищі значення a_1 зафіксовано для КФ штамів *A. cylindracea* 960, *F. velutipes* F-102, *P. pulmonarius* AX, які перевищують контроль у 2,4–2,7 рази.

Нижче контролю цей показник визначено для КФ штамів *S. commune*, деяких штамів видів *L. edodes*, *G. lucidum*, *I. lacteus* і *D. quercina*. Найменше значення a_1 встановлено для КФ свіжовиділеного штаму *S. commune* Sc-1104 — 9,7 од, що в 2,3 рази нижче контрольного.

Значення кута нахилу тензіограми (λ_2 , $\text{мН}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{с}^{1/2}$) наведено на рис. 6, контролем слугувало ГПС. Зазначимо, що цей показник корелює як з E ($r=0,81\pm 0,04$), так і з a_1 ($r=0,87 \pm 0,03$).

Наприкінці культивування у переважній більшості штамів (76%) спостерігається виражений вплив середовища на цей параметр у бік його значного збільшення. Найбільші значення λ_2 встановлено для штамів *A. cylindracea* 960, *F. velutipes* F-102 та F-610, *P. pulmonarius* MS-3 і AX. Для останньої культури цей показник більше контролю в 4,3 рази. З усіх вивчених лише один

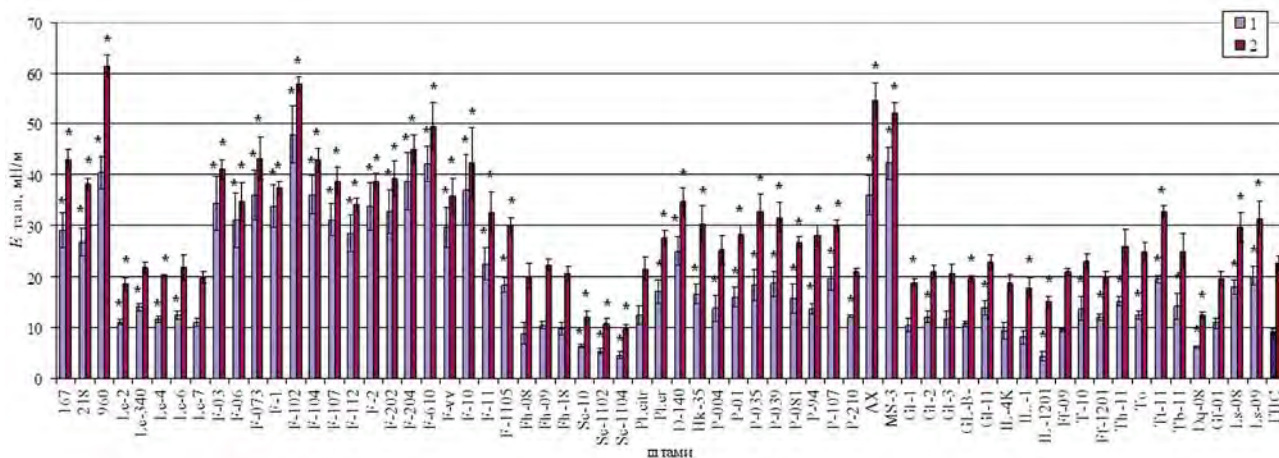


Рис. 5. Показники E (1) і a_1 (2) КФ досліджуваних штамів порівняно з контролем (вихідне ГПС) (тут і далі * — $P < 0,05$)

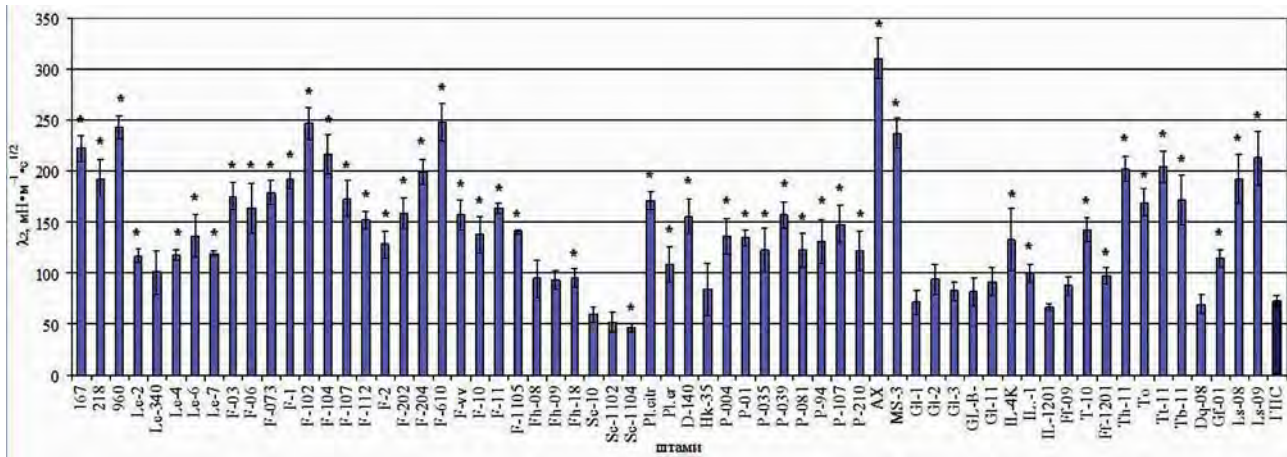


Рис. 6. Показник λ_2 КФ досліджуваних штамів порівняно з контролем (ГПС)

штам — *S. commune* Sc-1104 у процесі росту достовірно знижує значення λ_2 .

Зміну часу релаксації в стресовому експерименті (τ) КФ досліджуваних штамів відносно початкового ГПС (контроль) показано на рис. 7. Було встановлено, що статистично достовірно жоден штам не зменшує показник τ КФ, а 48% досліджених культур збільшують його в ході культивування. Максимальне значення τ КФ зафіксовано для штаму D-140 — 485,2 с, що в 2 рази вище контролю. Цей випадок не є типовим для культур роду *Pleurotus*, які неістотно впливали на реєстрований показник. Найвищі середні значення КФ спостерігали для видів *A. cylindracea*, *F. velutipes*, *F. hepatica* і *S. commune*.

Наступну тензіометричну характеристику КФ — коефіцієнт рівноважного поверхневого натягу (σ_4) подано на рис. 8.

Більшість штамів порядку *Agaricales* не впливають на цей показник. Тільки 7 дослі-

джуваних культур 6 видів — *A. cylindracea*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. citrinopileatus*, *P. eryngii* та *P. ostreatus* справляють достовірний вплив: F-vv, F-1105 — підвищують; 960, Le-340, Le-6, F-102, D-140 — знижують вихідне ПН ГПС, що становить 57,9 мН/м². На цьому тлі вирізняються всі штами видів *F. hepatica* і *P. pulmonarius*, які значно знижують ПН. Так, мінімальне значення σ_4 встановлено у штаму *P. pulmonarius* AX: 41,7 мН/м² — на 16,2 мН/м² нижче ПН вихідного середовища. А всі штами *S. commune* підвищують показник σ_4 . Так, максимальне значення зафіксовано для КФ штаму Sc-1104 — 66,5 мН/м², що на 8,6 мН/м² вище контролю.

На відміну від досліджуваних представників порядку *Agaricales*, більшість штамів порядку *Polyporales* спричинювали істотний вплив на коефіцієнт рівноважного поверхневого натягу КФ. Збільшували значення σ_4 культури видів *F. fomentarius*, *G. frondosa*

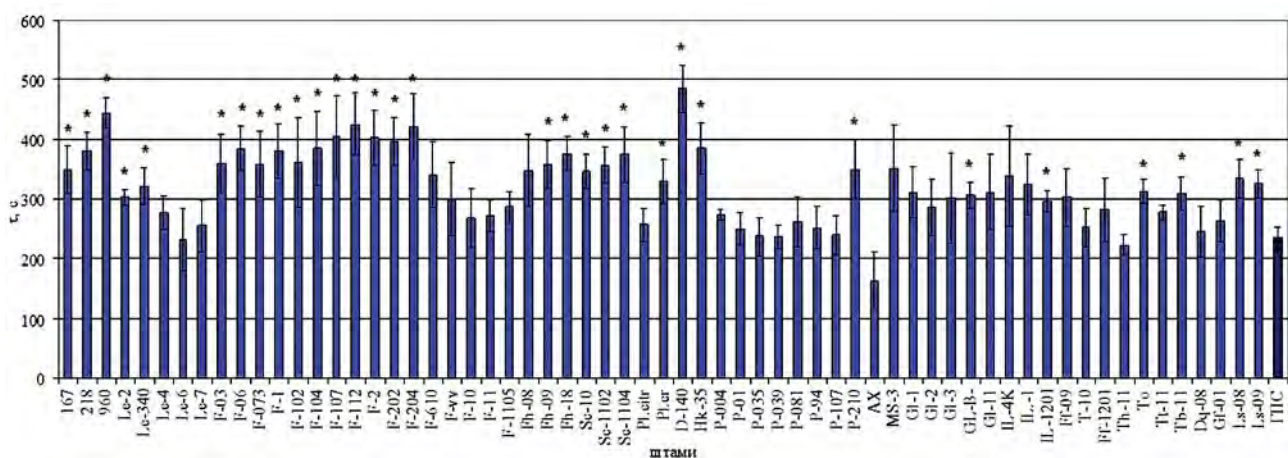


Рис. 7. Показник τ КФ досліджуваних штамів порівняно з контролем (ГПС)

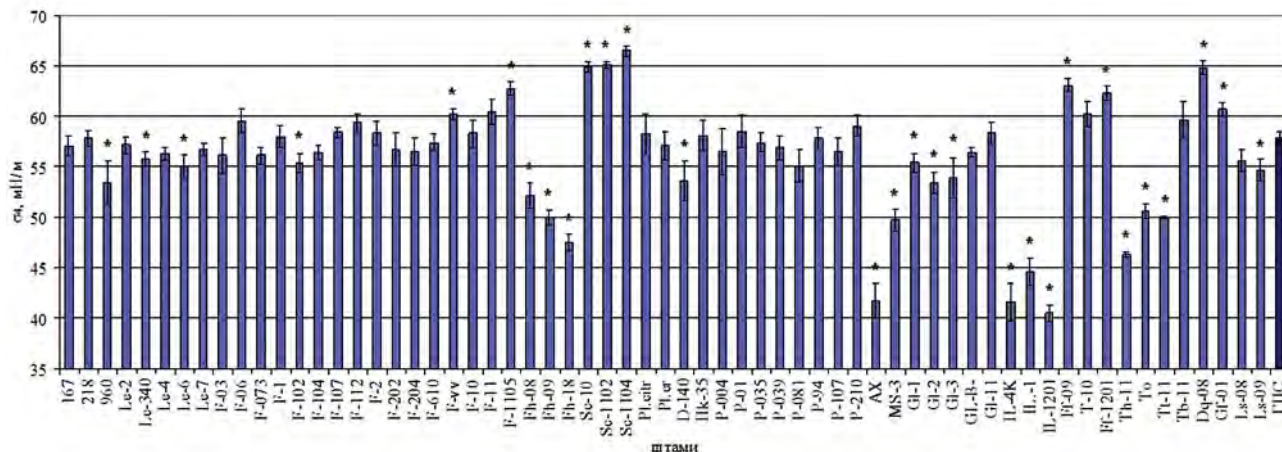


Рис. 8. Коефіцієнт рівноважного поверхневого натягу КФ досліджуваних штамів порівняно з контролем (ГПС)

і *D. quercina*. Максимум, який встановлено для штаму Dq-08, становить $64,8 \text{ мН/м}^2$ і вищий за вихідне значення на $6,9 \text{ мН/м}^2$. Зменшували цей показник культури видів *G. lucidum*, *T. hirsuta*, *T. ochracea*, *T. trogii*, *L. sulphureus*, *I. lacteus* із мінімальним значенням σ_4 у штаму IL-1201 $40,5 \text{ мН/м}^2$, яке на $17,4 \text{ мН/м}^2$ нижче за ПН вихідного середовища. Такі різкі видові відмінності можуть бути пов'язані з нерівномірним використанням поверхнево-активних компонентів живильного середовища різними культурами, що сприяє зростанню значення σ_4 . Продуктування ж біосурфактантів у КФ спричинює зниження його ПН. За допомогою статистичного аналізу встановлено негативні коефіцієнти кореляції показника σ_4 з b_1 , який становив $-0,64 \pm 0,08$, а також σ_4 з a_2 , який дорівнював $-0,63 \pm 0,08$. Тобто, чим нижчий коефіцієнт рівноважного поверхневого натягу (і тому вища адсорбція), тим більшою є дилатаційна пружність.

Встановлено, що значення кута нахилу поверхневої пружності від логарифму частоти осциляцій — b_1 і поверхневої в'язкості μ за частоти 1 рад/с — a_2 КФ перебуває у кореляційному зв'язку (коефіцієнт $r = 0,89 \pm 0,03$). Характеристики КФ b_1 і a_2 наведено на рис. 9.

Більшість досліджуваних штамів достовірно знижують показники b_1 та a_2 . Винятками є штами видів *A. cylindracea*, *P. pulmonarius*, *T. hirsuta* і *T. trogii*, культивування яких веде до зростання цих характеристик. Так, максимальні значення b_1 ($20,9 \text{ од.}$) та a_2 ($15,3 \text{ од.}$) встановлено для КФ штаму *P. pulmonarius* AX, які перевищують контрольні в $2,8$ і $2,5$ рази, відповідно. Низькі значення цих показників КФ серед видів порядку

Agaricales зареєстровано для *S. commune*, *L. edodes* і більшості штамів *F. velutipes*. Так, найменші значення b_1 і a_2 виявлено для штаму *S. commune* Sc-1104, які менше контролю в $4,7$ і $6,1$ рази, відповідно. Серед культур порядку *Polyporales* мінімальні значення b_1 і a_2 встановлено для штаму *D. quercina* Dq-08, які нижче вихідних в 5 і $2,2$ рази, відповідно. Низькі значення цих характеристик КФ також властиві видам *F. fomentarius*, *G. frondosa*, *T. biforme*, *L. sulphureus*, *G. lucidum*.

Для штамів з більш високими значеннями показників b_1 і a_2 також характерний і вищий рівень приросту біомаси (рис. 10). Коефіцієнти кореляції r становлять $0,61 \pm 0,08$ і $0,53 \pm 0,09$ для приросту АСБ з b_1 і a_2 , відповідно. Це може бути пов'язано з тим, що культури з високою інтенсивністю росту і метаболічних процесів швидше змінюють вихідний склад середовища, зокрема співвідношення різних ПАР в ній. Тобто, зміна цих характеристик КФ є прямим наслідком ростових процесів культур. Експериментальні дані з АСБ обробляли статистично, розраховуючи середнє значення з поправкою на стандартну похибку та порівнювали їх за критерієм Дункана (дані не порівнюються з контролем). Рис. 10 і 11 подано у вигляді гістограми із зазначенням вірогідного інтервалу [43].

Аналіз даних накопичення біомаси культурами за середньовидовими значеннями приросту АСБ у глибинній культурі (рис. 10.) дає змогу виділити дві групи. Перша група видів з високим АСБ — це *A. cylindracea* ($3,67 \text{ г/л}$), *F. hepatica* ($3,94 \text{ г/л}$), *S. commune* ($4,31 \text{ г/л}$), *P. pulmonarius* ($7,47 \text{ г/л}$), *T. hirsuta* ($3,87 \text{ г/л}$), *T. trogii*

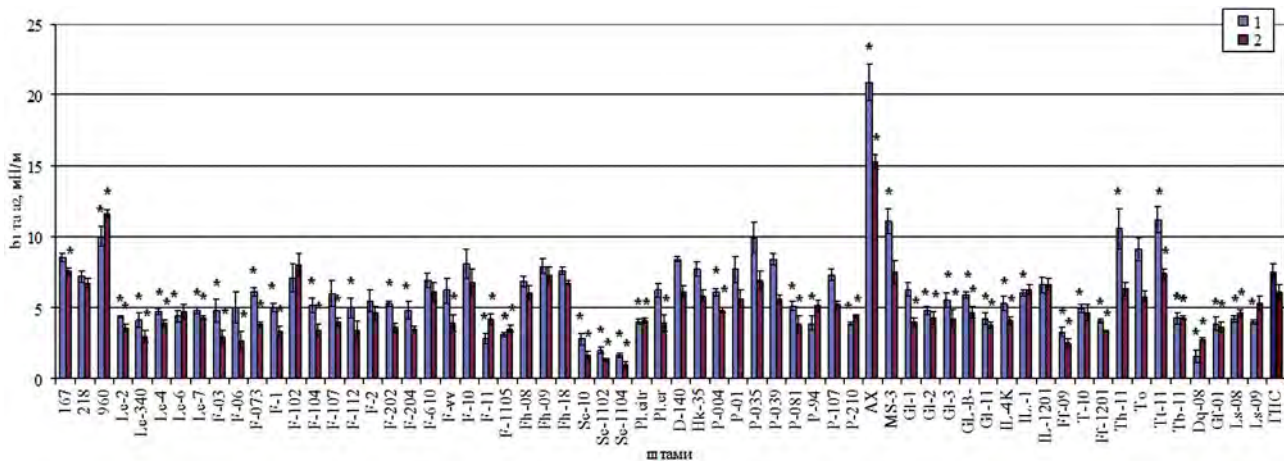


Рис. 9. Значення b_1 (1) та a_2 (2) КФ досліджуваних штамів порівняно з контролем (ГПС)

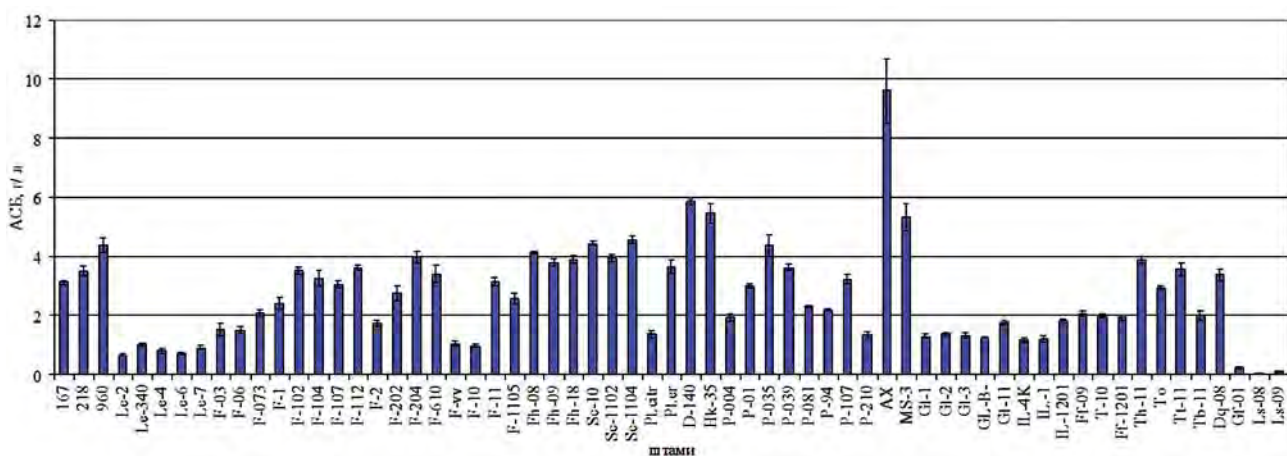


Рис. 10. Приріст АСБ досліджуваних штамів

(3,57 г/л) і *D. quercina* (3,38 г/л); друга — з низьким АСБ — це види *L. edodes* (0,83 г/л), *P. citrinopileatus* (1,36 г/л), *G. lucidum* (1,40 г/л), *I. lacteus* (1,39 г/л), *G. frondosa* (0,23 г/л) і *L. sulphureus* (0,07 г/л). Для штамів видів *P. ostreatus* та *F. velutipes* зафіксовано як високі, так і низькі показники приросту АСБ.

Зміна досліджуваних тензіореометричних характеристик культуральної рідини глибинних культур базидіоміцетів певною мірою може бути наслідком реакцій ПОЛ, що є предметом дослідження. Вміст продуктів ПОЛ в міцелії досліджуваних штамів показано на рис. 11.

Дані дослідження свідчать про те, що штами *F. velutipes* характеризуються одним із найвищих рівнів інтенсивності процесів ПОЛ у міцелії. Далі йдуть штами видів *P. eryngii*, *G. frondosa*, *S. commune*, *T. biforme*, *P. pulmonarius*, *F. hepatica*, *A. cylindracea* і *T. ochracea* із середнім рівнем реакцій ПОЛ. Види *L. edodes*, *P. citrinopileatus*, *P. ostreatus*,

T. ochracea, *T. hirsuta*, *G. lucidum*, *I. lacteus*, *D. quercina* і *F. fomentarius* мають низьку інтенсивність реакцій ПОЛ у міцелії. На рис. 11. не наведено показники вмісту ТВК-АП у міцелії штамів *L. sulphureus*, що пояснюється недостатнім рівнем накопичення біомаси — необхідного матеріалу для проведення дослідження. Для решти штамів було розраховано коефіцієнт кореляції вмісту ТВК-АП у міцелії штамів і модулем в'язкопружності E , який становив $0,58 \pm 0,08$ од. Оскільки підвищення рівня ПОЛ у міцелії може свідчити про дію негативних факторів середовища [44], збільшення значення модуля в'язкопружності КФ може певною мірою її відобразити. Однак для встановлення подібної залежності необхідно провести додаткові дослідження щодо впливу різних чинників і їх доз на певний штам.

Для виявлення впливу накопичення продуктів ПОЛ у КФ на тензіореологічні характеристики вимірювали вміст ТВК-АП також і в КФ культур досліджуваних штамів (рис. 12).

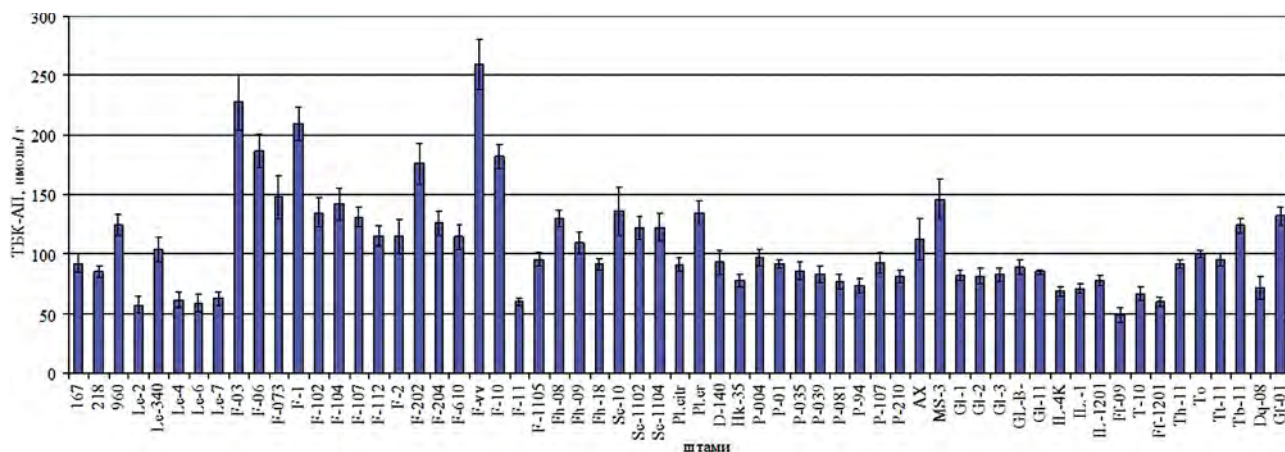


Рис. 11. Вміст ТБК-активних продуктів у міцелії досліджуваних штамів

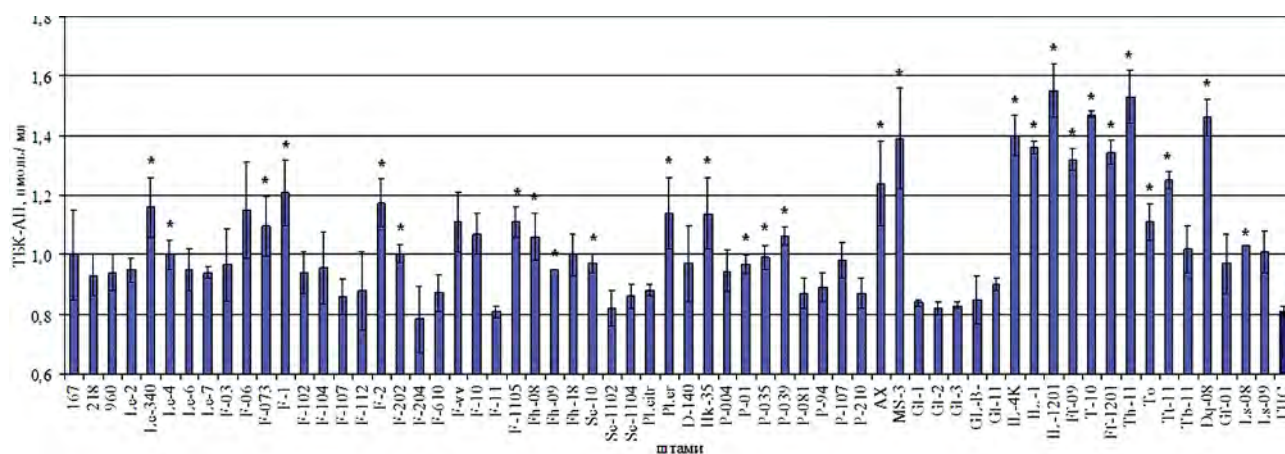


Рис. 12. Вміст ТБК-АП у КФ культур досліджуваних штамів порівняно з контролем (ГПС)

Встановлено, що найбільший вміст продуктів ПОЛ у КФ наприкінці ферментації є характерним для штамів сімейств *Phanerochaetaceae*, *Polyporaceae* і *Fomitopsidaceae* порядку *Polyporales*. Найвищі середньовидові значення цих показників встановлено для *I. lacteus* (1,44 нмоль/мл), *F. fomentarius* (1,38 нмоль/мл), *T. hirsuta* (1,53 нмоль/мл), *D. quercina* (1,46 нмоль/мл). Високий, але нижчий за абсолютними значеннями, вміст ТБК-АП у КФ культур порядку *Agaricales* характерний для штамів *P. pulmonarius*. Статистична обробка результатів дослідження не виявила вираженої кореляції рівня вмісту продуктів ПОЛ у КФ із тензіореометричними показниками.

Таким чином, результати дослідження тензіореометричних параметрів культуральної рідини глибоких культур базидіоміцетів дають підстави зробити такий висновок. Апробовані й модифіковані нами методи мають необхідну високу чутливість під час роботи з мікологічним матеріалом. Особли-

вості росту й утворення пелетів не справляють впливу на досліджувані характеристики. Показники міжфазної тензіометрії та реометрії залежать від видової належності культури і пов'язані з її фізіологічними особливостями, що уможлиблює використання комплексу тензіореометричних параметрів для систематичної ідентифікації культур і як критерію відбору штамів-продуцентів біосурфактантів. Встановлено кореляційні зв'язки тензіореометричних характеристик КФ між собою і з показниками росту й інтенсивності ПОЛ культур, що дає змогу отримати інтегральний показник, який відображає стан метаболічних процесів глибокої культури. Відібрано штами базидіоміцетів *F. hepatica* Fh-18, *S. commune* Sc-1104, *P. pulmonarius* AX, *T. hirsuta* Th-11, *D. quercina* Dq-08 — потенційних штамів-продуцентів біосурфактантів, що мають високу інтенсивність росту і ПОЛ.

Відсутність тензіореометричних досліджень глибоких культур базидіоміцетів зумовлює актуальність подальших досліджень у цьому напрямі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Феофилова Е. П. Новые биотехнологии получения биологически активных веществ из мицелиальных грибов // Усп. мед. микол. — 2007. — Т. 9. — С. 195–196.
2. Villas-Boas S., Esposito G. E., Mitchell D. A., Villas-Boas S. G. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds // Anim. Feed Sci. Technol. — 2002. — V. 98. — P. 1–12.
3. Wasser S. P., Sytnik K. M., Buchalo A. S., Solomko E. F. Medicinal mushrooms: past, present and future // Ukr. Botan. Journ. — 2002. — V. 59, N 5. — P. 499–524.
4. Антоненко Л. О., Кучма В. М., Крижук Ю. С. Вплив джерел живлення на ріст грибів роду *Coriolus* Quel (*Trametes* Fr.) і їх антиокиснювальну активність // Наук. вісті НТУУ «КПІ». — 2010. — № 3. — С. 10–15.
5. Бабицкая В. Г., Щерба В. В., Гвоздкова Т. С. Новые биологически активные добавки на основе глубинного мицелия базидиальных грибов // Усп. мед. микол. — 2006. — Т. 7. — С. 178–180.
6. Ліновська В. М., Бухало А. С., Дуган О. М. Підбір умов глибинного культивування *Grifola frondosa* як основи для створення біотехнологій отримання лікувально-профілактичних препаратів // Наук. вісті НТУУ «КПІ». — 2011. — № 3. — С. 56–60.
7. Уфимцева О. В., Миронов П. В. Получение биомассы мицелия грибов вешенки обыкновенной Р 05/88 *Pleurotus ostreatus* и серно-желтого трутовика LS 1-06 *Laetiporus sulphureus* в глубинных условиях // Хвойные бореальной зоны. — 2009. — Т. 26, № 2. — С. 294–296.
8. Щерба В. В., Бабицкая В. Г. Углеводы глубинного мицелия ксилотрофных базидиомицетов // Прикл. биохим. микробиол. — 2004. — Т. 41, № 2. — С. 194–199.
9. Винаров А. Ю., Гордеев Л. С., Кухаренко А. А., Панфилов В. И. Ферментационная аппаратура для процессов микробиологического синтеза / Под ред. В. А. Быкова. — М., 2005. — 278 с.
10. Garibova L. V., Antimonova, A. V., Zav'yalova L. A., Krasnopol'skaya L. M. Growth and Morphological Characteristics of the Reishi mushroom *Ganoderma lucidum* as Functions of Cultivation Conditions // Mikol. Fitopatol. — 2003. — V. 37, N 3. — P. 14–19.
11. Kim S. W., Hwang H. J., Park J. P. et al. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media // Lett. Appl. Microbiol. — 2002. — V. 34. — P. 56–61.
12. Campeanu G., Pele M., Cimpanu M. Studies on the rheological properties of the fermentation broth in the production of pectolytic enzymes // Int. Agrophysics. — 1999. — V. 13. — P. 421–424.
13. Wösten H. A. B., Willey J. M. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air // Microbiology. — 2000. — V. 146. — P. 767–773.
14. Linder M. B., Szilvay G. R., Nakari-Setälä T., Penttilä M. E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi // FEMS Microbiol. Rev. — 2005. — V. 29. — P. 877–896.
15. Wösten H. A. B., Wessels J. G. H. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development // Mycoscience. — 1997. — V. 38. — P. 363–374.
16. Капич А. Н., Корнейчук Т. В. Определение антиоксидантной активности на модели перекисного окисления линолевой кислоты, иницированного грибной марганец пероксидазой // Усп. мед. микол. — 2007. — Т. 9. — С. 162–164.
17. Капич А. Н. Сопряжение перекисного окисления липидов с деградацией лигнина у дереворазрушающих базидиомицетов // Микробн. биотехнол.: фундамент. прикл. асп.: Сб. науч. тр. — 2011. — № 3. — С. 316–335.
18. Hammel K. E., Kapich A. N., Jensen K. A. Jr., Ryan Z. C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi // Enzyme and Microbial Technology. — 2002. — V. 30. — P. 445–453.
19. Pozdnyakova N. N., Nikiforova V. O., Turkovskaya O. V. Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1 S // Cent. Eur. J. Biol. — 2010. — V. 5, N 1. — P. 83–94.
20. Wasser S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — V. 89. — P. 1323–1332.
21. Bezalel L., Hadar Y., Fu P. P. et al. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* // Ibid. — 1996. — V. 62. — P. 2547–2553.
22. Valentin L., Feijoo G., Moreira M. T., Lema J. M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi // Int. Biodeterior. Biodegr. — 2006. — V. 58. — P. 15–21.
23. Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents // Biotechnol. Adv. — 2003. — V. 22. — P. 161–187.

24. *Winqvist E., Moilanen U., Mettala A. et al.* Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi // *Biochem. Eng. J.* — 2008. — V. 42. — P. 128–132.
25. *Ron E. Z., Rosenberg E.* Biosurfactants and oil bioremediation // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2002. — V. 13. — P. 249–252.
26. *Rosenberg E., Navon-Venezia S., Ron E. Z.* Rate-limiting steps in the microbial degradation of petroleum hydrocarbons / *Soil and Aquifer Pollution* / Ed. by Rubin H. — Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. — P. 159–172.
27. *Tugrul T., Cansunar E.* Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2005. — V. 21. — P. 851–853.
28. *Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S.* Potential commercial applications of microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2000. — V. 53. — P. 495–508.
29. *Makkar R. S., Cameotra S. S., Banat I. M.* Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production // *AMB Exp.* — 2011. — V. 1, N 5. — P. 1–19.
30. *Гоготов И. М., Белоножкин С. В., Ходаков Р. С., Шкидченко А. М.* Биосурфактанты: продуценты, свойства и практическое использование / Матер. 3-й Межд. конф. «Международное сотрудничество в биотехнологии: ожидания и реальность». — Пущино: ИЦ «Биоресурсы и экология», 2006. — С. 104–111.
31. *Desai J. D., M.* Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1997. — V. 61, N 1. — P. 47–64.
32. *Абрамзон А. А., Зайченко Л. П., Райнгольд С. И.* Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, применение. — Л.: Химия, 1988. — 200 с.
33. *Федотов О. В., Чайка О. В., Волошко Т. С., Велигодська А. К.* Колекція культур шапінкових грибів — основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів // *Вісн. Донецького нац. ун-ту. Сер. А. Природн. науки.* — Донецьк, ДонНУ, 2012. — № 1. — С. 209–213.
34. *Бухало А. С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. — К.: Наук. думка, 1988. — 144 с.
35. *Дудка И. А., Вассер С. П., Элланская И. А.* Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
36. *Kazakov V. N., Knyazevich V. M., Sinyachenko O. V. et al.* Interfacial Rheology of Biological Liquids: Application in Medical Diagnostics and Treatment Monitoring / *Interfacial Rheology.* — V. 1, *Progress in Colloid and Interface Science*, R. Miller and L. Liggieri (Eds.), Brill Publ., Leiden, 2009. — P. 519 — 566.
37. *Zaitsev S. Yu., Milaeva I. V., Zarudnaya E. N., Maximov V. I.* Investigation of dynamic surface tension of biological liquids for animal blood diagnostics // *Coll. Surf.* — 2011. — V. 383. — P. 109–113.
38. *Kazakov V. N., Vozianov A. F., Sinyachenko O. V. et al.* Studies on the application of dynamic surface tensiometry of blood and cerebrospinal liquid for the diagnostics and treatment control of rheumatic, neurological and oncological diseases // *Adv. Coll. Interface Sci.* — 2000. — V. 86. — P. 1–38.
39. *Kazakov V. N., Barkalova E. L., Levchenko L. A. et al.* Dilation rheology as medical diagnostics of human biological liquids // *Coll. Surf.* — 2011. — V. 391. — P. 190–194.
40. *Zholob S. A., Makievski A. V., Miller R., Fainerman V. B.* Advances in calculation methods for the determination of surface tensions in drop profile analysis tensiometry / *Bubble and Drop Interfaces.* — V. 2. — *Progress in Colloid and Interface Science*, R. Miller and L. Liggieri (Eds.), Brill Publ., Leiden, 2011. — P. 49–74.
41. *Файнерман В. Б., Файнерман В. Б., Уманский В. Я.* О контроле содержания органических соединений в питьевой и природной воде методом межфазной тензиометрии // *Вестн. гиг. эпидемиол.* — 2006. — V. 10, N 1. — С. 181–185.
42. *Рішення про видачу патенту України на корисну модель «Спосіб визначення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів культур базидіоміцетів» від 14.11.2012 р.* Заяв. № u201208872.
43. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
44. *Пат. 57945 України.* Спосіб мікотестування забруднення навколишнього середовища фенолом / Федотов О. В., Перцевой М. С. — Заявка № u201009019 від 19.07.2010, МПК (2011.01), кл. A01G7/00, A01H15/00, Бюл. № 6 від 25.03.2011.

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
МЕЖФАЗНОЙ ТЕНЗИОМЕТРИИ
И РЕОМЕТРИИ
КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ
КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ**

*О. В. Чайка*¹
*О. В. Федотов*¹
*В. Б. Файнерман*²
*С. В. Лылык*²

¹Донецкий национальный университет,
Украина

²Донецкий национальный медицинский
университет, Украина

E-mail: bio.graff@yandex.ua

Исследованы тензиореометрические характеристики фильтрата культуральной жидкости глубинных культур 63 штаммов 19 видов базидиомицетов методом анализа формы осесимметричных висящих капель. Метод обладает необходимой высокой чувствительностью при работе с микологическим материалом. Установлено, что показатели межфазной тензиометрии и реометрии в высокой степени зависят от видовой принадлежности культуры, на основании чего предложено использовать этот комплекс тензиореометрических параметров для систематической идентификации культур и как критерий отбора штаммов-продуцентов биосурфактантов. Выявлены корреляционные связи тензиореометрических характеристик фильтрата культуральной жидкости как между собой, так и с показателями роста и интенсивности пероксидного окисления липидов культур. Это позволяет получить интегральный показатель, отражающий состояние метаболических процессов глубинной культуры. По результатам исследования отобраны штаммы базидиомицетов — потенциальные продуценты биосурфактантов, обладающие высокой скоростью роста и интенсивностью липидной пероксидации для использования в биотехнологическом производстве.

Ключевые слова: ксилотрофные базидиомицеты, глубинное культивирование, межфазная тензиометрия, реометрия, пероксидное окисление липидов.

**BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS
OF INTERFACIAL TENSIOMETRY
AND RHEOMETRY OF XYLOTROPHIC
BASIDIOMYCETES CULTURE FLUID**

*A. V. Chaika*¹
*O. V. Fedotov*¹
*V. B. Fainerman*²
*S. V. Lylyk*²

¹Donetsk National University, Ukraine

²Donetsk National Medical University, Ukraine

E-mail: bio.graff@yandex.ua

The tensio-rheometric characteristics of 63 strains belonging to 19 basidiomycetes species submerged culture filtrate were investigated by the axisymmetric pendent drop profile analysis. The method showed required high sensitivity with mycological material. It was found that the interfacial tensiometric and rheometric parameters depend significantly on culture species, hence it is proposed to use ones complex for systematic identification of cultures and as a selection criterion for biosurfactants-producing strains of basidiomycetes. Correlations of tensio-rheometric characteristics both among themselves and with the culture growth and lipid peroxidation rates were found. This provides an integrated indicator of the submerged culture metabolic state. By the results of the study several strains of basidiomycetes — potential producers of biosurfactants with a high growth rate and intensity of lipid peroxidation were selected for biotechnological manufacture.

Key words: xylotrophic basidiomycetes, submerged fermentation, interfacial tensiometry and rheometry, lipid peroxidation.