

УДК 664.8.002.8:635.656

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПЛОДОВЫХ ТЕЛ *GRIFOLA FRONDOSA* (DICKS: FR.) S.F.GRAY (*BASIDIOMYCETES, POLYPORACEAE*)

И.И.Полохина\*, С.Д.Трискиба\*\*, Л.В.Каниболоцкая, И.Д.Одарюк, А.Н.Шендрик

\*Донецкий институт социального образования,

\*\*Государственное управление экологии и природных ресурсов Донецкой области

**Введение.** Макромицеты широко используются в качестве ценного продукта питания и как технологическое сырьё в хлебопекарной, молочной, сыроваренной промышленности, в виноделии и т.д. В начале XX в. использование микологического сырья дало возможность получения антибиотиков, витаминов, органических кислот и большого спектра лекарственных препаратов. Велико значение грибных препаратов в лесном и сельском хозяйстве.

В последние годы внимание ученых привлечено к проблемам биосинтеза грибами биологически активных веществ с иммуномодулирующими, радиопротекторными, противоопухолевыми, противотуберкулезными и др. свойствами [1].

В работах отечественных и зарубежных авторов показано, что в грибах содержатся вещества, способные в малых концентрациях вызывать торможение свободнорадикальных реакций окисления органических субстратов [2-3], что важно для профилактики многих патологических состояний, обусловленных активацией перекисидации липидов [4]. К ним относятся фенольные соединения, ферменты системы антиоксидантной защиты макромицета, белковые соединения, амины. В связи с этим, особый интерес представляют исследования направленные на поиск потенциальных источников веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантными свойствами.

**Экспериментальная часть.** В настоящей работе материалом для исследования антиоксидантной активности (АОА) в опытах *in vitro* служили образцы мицелия, культуральной жидкости, и плодовых тел съедобного лекарственного гриба *Grifola frondosa* (Dicks: FR.) S.F.Gray (грифола курчавая, майтаке), который принадлежит к семейству *Polyporaceae*, порядку *Poriales*, классу *Basidiomycetes*, взятых из естественных условий произрастания [5].

Все собранные образцы хранились в стерильных условиях по методу выделения чистых культур [6] и все дальнейшие исследования проводили в стерильных условиях для предотвращения контаминации системы. После сбора плодовые тела сохранялись в морозильной камере при температуре  $-36^{\circ}\text{C}$  в течение 2 месяцев, в процессе работы сырьё хранили при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Плодовое тело было разделено на шляпочную часть и ножку, которые изучали после высушивания, замораживания-оттаивания, тепловой обработки. Перед опытом мицелий экстрагировали водой при  $50-60^{\circ}\text{C}$  в течение 3 часов. Культуральную жидкость тестировали в количестве 0.2 мл. Плодовое тело измельчали, затем 3 г экстрагировали бидистиллированной водой при  $50-60^{\circ}\text{C}$  в течение 3 часов [7].

Для тестирования антиоксидантных свойств использовали систему, моделирующую процессы перекисидации липидов [8]. Особенностью этого окисления является протекание процесса в эмульсии, на границе раздела фаз. Инициаторами процесса окисления выступали двухвалентное железо и аскорбиновая кислота. Для этого 0.2 мл экстракта добавляли в окисляющуюся кислородом воздуха смесь следующего состава: 2 мл 1% водного раствора Твин-80 (полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат), 0.2 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора соли двухвалентного железа ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0.2 мл  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л водного раствора аскорбиновой кислоты [9]. В контрольный раствор вместо испытуемого субстрата вносили 0.2 мл дистиллированной воды. По прошествии 48 часов проводили фотоколориметрическое определение продуктов окисления в контрольных и опытных пробах. Снижение концентрации продуктов иницированного окисления в опытных пробах по сравнению с контрольными свидетельствует об антиоксидантной активности испытуемого субстрата.

АОА водных экстрактов образцов гриба оценивали по интенсивности торможения накопления продуктов перекисного окисления, которые реагируют с 2-тиобарбитуровой кислотой [10] по формуле:

$$\text{АОА} = \frac{D_k - D_{\text{оп}}}{D_k} \cdot 100\%,$$

где  $D_k$ ,  $D_{\text{оп}}$  – оптическая плотность в контрольных и тест-образцах соответственно.

Статобработку результатов проводили по общепринятой схеме с использованием методов статистики (критерий Стьюдента). Достоверно различными считали результаты при  $P \leq 0.05$ .

**Основной раздел.** Исследована антиоксидантная активность мицелия, культуральной жидкости и плодовых тел *G. frondosa*, собранных на территории НПП «Святые Горы» в Донецкой области [3]. Как редкий вид *Grifola frondosa* занесена в "Красную Книгу" Украины и России [11-12]. Из данного базидиомицета получен препарат грифолан с выраженным противобактериальным, противоопухолевым, иммуностимулирующим, противогрибковым действием [13].

Полученные данные по накоплению продуктов, образующихся при окислении Твина-80 в присутствии экстрактов культуральной жидкости *G. frondosa* приведены в табл. 1.

Таблица 1  
Антиоксидантная активность культуральной жидкости гриба *G. frondosa* при окислении Твина-80. T = 313K

T, °C	АОА, %		
	25 дней	30 дней	35 дней
17.5	-	-	-
22	4.7±0.4	13±1	9.3±0.7
27.5	3.6±0.3	30±2	-
29	5.2±0.4	19±2	-

Анализируя взаимосвязь между сроками выращивания и АОА необходимо отметить, что культуральная жидкость показывает максимальную АОА на 30 сутки роста гриба при всех температурах выращивания (табл. 1). При температуре 17.5°C не наблюдается АОА. Повышение температуры культивирования приводит к увеличению ингибирующих свойств. Оптимальной в изученном интервале является температура 27.5°C. Дальнейшее повышение температуры выращивания, исходя из полученных данных, является нецелесообразным. Следовательно, оптимальными параметрами культивирования *G. frondosa* для получения культуральной жидкости с наибольшей АОА является температура 27.5°C при длительности выращивания 30 суток.

Мицелиальную биомассу экстрагировали двумя способами – получали водную и водно-спиртовую (60/40) вытяжки, которые проявили разную динамику АО свойств при разных условиях культивирования. Водный экстракт мицелия проявлял максимальную ингибирующую активность на 30 сутки культивирования (табл.2). В зависимости от температуры культивирования и возраста мицелия показатели АОА колебались от 7.8 до 58%. Мицелий возраста 30-ти суток проявлял наибольшую для данного эксперимента АОА. Минимальные ингибирующие свойства проявлялись при температуре 29°C, а максимальные — при 25°C (27 и 58% соответственно).

На 35-е сутки культивирования для мицелия более характерна динамика изменений АОА аналогичная 30-ти суточному мицелию, но показатели были более низкими. Так, минимальные ингибирующие свойства тоже проявлялись при температуре 29°C, но имели значение 20%, а максимальные ингибирующие способности при 27.5°C — 39%.

Анализ динамики АОА у мицелия разного возраста, культивируемого при разных температурах на одинаковых средах показал, что при 22°C и 25°C максимум АОА наблюдается на 30-е сутки роста, при температуре 27.5°C – на 35-е сутки, а при 29°C – на 25-е сутки. Такая закономерность объясняется, вероятно, ускорением процессов развития и старения мицелия при температурах 27.5°C и 29°C.

Таблица 2  
Антиоксидантная активность культурального мицелия гриба *G. frondosa* при окислении Твина-80 (\*пробы, полученные водно-спиртовой экстракцией). T = 313K

T, °C	АОА, %		
	25 дней	30 дней	35 дней
17.5	-	-	-
22	7.8±0.6	41±3 (4.9±0.4)*	28±2
25	-	58±5 (4.6±0.4)*	34±3
27.5	-	35±3 -*	39±3
29	43±3	27±2 -*	-

Так же следует отметить, что пробы, полученные водной экстракцией культурального мицелия проявили низкую (1-5%) АОА.

Поскольку *G. frondosa* относится к съедобным макромицетам, особый интерес представляли исследования ингибирующего действия плодового тела этого гриба с целью выявления комбинированных продуктов питания, сочетающих в себе и питательную ценность, и обладающих определенной физиологической активностью.

Все исследованные водные экстракты разных частей плодовых тел проявляют антиоксидантную активность. Ингибирующее действие водных экстрактов зависит от части плодового тела, которая была использована для экстракции, способа обработки (высушивание, замораживание, тепловая обработка). Степень ингибирования перекисного окисления Твина-80 наиболее выражена у образца ножки, подвергнутой тепловой обработке. При всех способах обработки экстракты шляпки проявляют меньшую антиоксидантную активность по сравнению с ножкой гриба. Такое различие в антиоксидантном действии шляпок и ножек связано, вероятно, с физиологией поступления питательных веществ из древесного субстрата (дуб) в плодовое тело через ножку к шляпке.

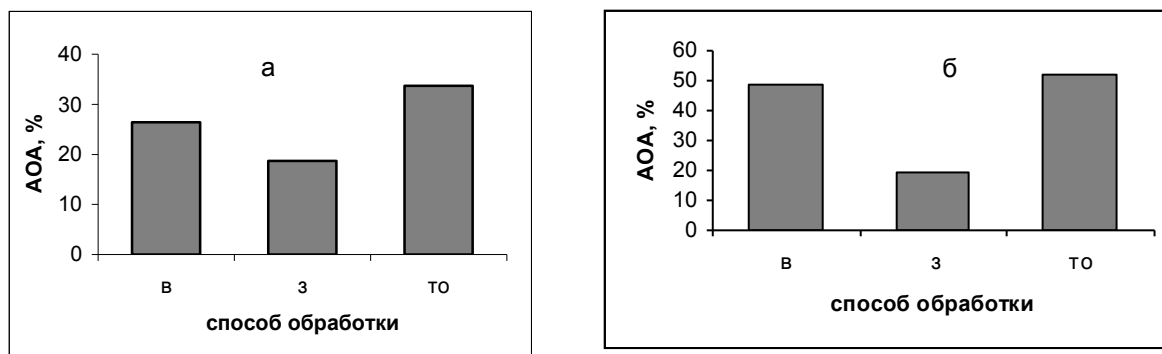


Рис. 1. Зависимость антиоксидантной активности шляпок (а) и ножек (б) плодовых тел *G. Frondosa* от способа обработки: высушивание (в) (T=298K), замораживание (з) (T=263K), термическая обработка (то) (373K)

На рис. 1 приведены гистограммы зависимости антиоксидантной активности от способа обработки сырья. Как видно из рисунка, наиболее выраженной антиоксидантной активностью обладают образцы, подвергшиеся термической обработке, наименьшим ингибирующим действием – образцы, подвергшиеся заморозке. Такое различие в обработке может быть связано с тем, что в экстрактах, кроме низкомолекулярных веществ, имеются соединения белковой природы, денатурация которых может приводить к высвобождению активных функциональных групп, способных проявлять АОА.

Гриб *G. frondosa* по способности разлагать компоненты древесины относится к лигнинразрушающим или грибам белой гнили. К грибам, вызывающим белую гниль, относятся также *Inonotus obliquus* (чага), *Ganoderma lucidum* (рейши), известные своими лекарственными, в частности, противораковыми, радиопротекторными, иммуномодулирующими свойствами. Сравнительный анализ полученных нами результатов с литературными данными [4] по ингибирующему действию *Inonotus obliquus* (чага), *Ganoderma lucidum* (рейши) в процессе окисления метилолеатной модели с АОА *G. frondosa* при окислении олеиновой кислоты в составе Твина-80 показывает, что данные макромицеты сопоставимы по антиоксидантным свойствам. Высокая физиологическая активность этого вида базидиомицетов, вероятно, связана с участием компонентов грибов в нормализации процессов перекисного окисления липидов за счет накопления в плодовых телах соединений фенольного ряда, являющихся мономерными звеньями лигнина.

#### Выводы.

1. Установлено, что водные экстракты дереворазрушающего гриба *G. frondosa* проявляют высокую антиоксидантную активность в процессе инициированного окисления Твина-80.
2. Выявлены наиболее эффективные способы обработки плодового тела гриба для получения экстрактов с наибольшей антиоксидантной активностью.

#### РЕЗЮМЕ

Показано, що водні екстракти дереворуйнівного гриба *G. frondosa* проявляють високу антиоксидантну активність. Вивчено розподіл речовин, що проявляють антиоксидантні властивості, в масі грибу і встановлено, що їх максимальна кількість міститься в ніжці. Виявлені найбільше ефективні способи обробки плодового тіла для отримання екстрактів з найбільшою антиоксидантною активністю.

## SUMMARY

The aqueous extracts of wood-destructive fungus *G. Frondosa* was shown to have high antioxidant activity. The distribution of the substances in the fungus body has been studied. The highest possible amount of the substance was established to contain in the stipe. The most effective treatment methods of the fungus body for getting extracts with a high antioxidant activity were discovered.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бухало А.С. Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями / А.С.Бухало, Е.Ф.Соломко, Н.Ю.Митропольська // Укр. ботан. журн. – 1996. – Т. 53, №3. – С. 192-201.
2. Hu Sh. H. Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of Extracts from *Pleurotus citrinopileatus* / Sh. H. Hu, Z.Ch.Liang, Y. Ch. Chen. // J. Agric. Food Chem. – 2006. – Vol. 54. – P. 2103-2110.
3. Wasser S.P. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S.P. Wasser, A.L. Weis // Crit. Rev. Immunol. – 1999. – Vol. 19. – P. 65-96.
4. Капич А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов / А.Н.Капич, Л.Н.Шишкина // Микология и фитопатология – 1992. – Т. 26, №6. – С. 486-492.
5. Трискиба С.Д. Знахідка *Grifola frondosa* (Dicks: FR.) S.F.Gray на півночі Донецької області / С.Д.Трискиба, І.І.Полохіна, М.М.Сухомлин // Укр. ботан. журн. – 2005. – Т. 62, №1. – С. 87-90.
6. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. / И.А.Дудка и др. – Киев: Наукова думка, 1982. 550с.
7. Ооржак У.С. Исследование влияния технологических факторов на процесс извлечения экстрактивных веществ из лиственной губки / У.С.Ооржак, В.М.Ушанова, С.М.Репях // Химия растительного сырья. – 2003. – №1. – С. 69-72.
8. Опейда И.А. Кинетика поглощения кислорода и хемилюминесценции при окислении липидов в присутствии ионов  $Fe^{2+}$  / И.А.Опейда, А.Н.Шендрик, И.О.Качурин и др. // Кинетика и катализ. – 1994. – Т. 35, №1. – С. 38-44.
9. Благородов С.Г. Определение антиокислительной активности химических соединений / С.Г.Благородов, А.П.Шепелев, Н.А.Дмитриева и др. // Хим. – фарм. журнал – 1987. – Т. 21, №3. – С.292-296.
10. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с 2-тиобарбитуровой кислотой / Л.И.Андреева, Л.А.Кожмякин, А.А.Кишкун // Лаб. Дело. – 1988. – №11. – С. 41-43.
11. Красная книга СССР (1984). – М.: Лесная промышленность. – Т. 1. – 460 с.
12. Червона книга України. Рослинний світ / Відп.ред. Шеляг-Сосонко Ю.Р. – К.: Українська енцикл-я, 1996. – 608 с.
13. Chen Al. W.. A Practical Guide for Synthetic-Log Cultivation of Medicinal Mushroom *Grifola frondosa* (Dicks: FR.) S.F.Gray (Maitake) / Al. W. Chen // Int. J. of Medicinal Mushrooms. – 1999. – Vol. 1, №2. – P. 153-167.

Поступила в редакцію 23.04.2010 г.