

**ПОГРУЖЕННАЯ КУЛЬТУРА *PLEUROTUS ERYNGII*:
АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СПОСОБНОСТЬ
К ОБРАЗОВАНИЮ ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА СТЕРОЛОВ**

Краснопольская Лариса Михайловна

*д-р биол. наук, зав. лабораторией, Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»,
119023, Россия, г. Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11
E-mail: lkrasnopolskay@yandex.ru*

Тренин Алексей Сергеевич

*д-р биол. наук, зав. сектором, Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»,
119023, Россия, г. Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11
E-mail: as-trenin@mail.ru*

Бычкова Ольга Петровна

*канд. биол. наук, старший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»,
119023, Россия, г. Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11
E-mail: olrika@mail.ru*

Цвигун Елена Анатольевна

*научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»,
119023, Россия, г. Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11
E-mail: tsvigun_lena@mail.ru*

Джавахан Баграт Романович
магистрант Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова,
119991, Россия, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1
E-mail: dbag23@mail.ru

**SUBMERGED CULTURE OF *PLEUROTUS ERYNGII*: ANTIBIOTIC
ACTIVITIES AND ABILITY TO PRODUCE THE INHIBITORS
OF STEROL BIOSYNTHESIS**

Larissa Krasnopolskaya
Doctor of biological sciences, PhD, head of laboratory,
Gause Institute of New Antibiotics,
119023, Russia, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya str., 11

Alexey Trenin
Doctor of biological sciences, PhD, head of sector,
Gause Institute of New Antibiotics,
119023, Russia, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya str., 11

Olga Bychkova
Candidate of biological sciences, senior research scientist,
Gause Institute of New Antibiotics,
119023, Russia, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya str., 11

Elena Tsvigun
Research scientist, Gause Institute of New Antibiotics,
119023, Russia, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya str., 11

Bagrat Dzhavakhyan
Master's degree student of Lomonosov Moscow State University,
119991, Russia, Moscow, Lenin Mountains str., 1

АННОТАЦИЯ

Погруженное культивирование шести штаммов лекарственно-съедобного базидиального гриба *Pleurotus eryngii* (D.C.) Quéf. показало, что выход их воздушно-сухой биомассы в неоптимизированных условиях варьирует от 11,4 до 18,0 г/л. Охарактеризованы микроморфологические черты погруженного мицелия изученных штаммов: форма пеллет и наличие пряжек на гифах. В ходе исследования выявлены штаммы *P. eryngii*, обладающие

умеренной антибактериальной активностью в отношении грамположительных (*Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий, а также антифунгальной активностью в отношении мицелиального гриба *Aspergillus niger*. С использованием модели галофильной бактерии *Halobacterium salinarum* показано, что все изученные штаммы образуют ингибиторы биосинтеза стеролов (ИБС). Ингибиторы ранних этапов биосинтеза стеролов, подавляющее действие которых на рост *H. salinarum* снималось в присутствии экзогенной мевалоновой кислоты, находились преимущественно в культуральной жидкости продуцентов, так же как и ингибиторы поздних (после образования мевалоната) этапов. Штаммы, образующие ингибиторы поздних этапов биосинтеза стеролов, в большинстве случаев обладали антифунгальной активностью. Полученные результаты показали, что способность культур *P. eryngii* к образованию ИБС является штаммоспецифической. Результаты, полученные в ходе этого исследования, позволили отобрать для дальнейшей работы штаммы *P. eryngii*, способные к образованию ингибиторов как ранних, так и поздних этапов биосинтеза стеролов.

ABSTRACT

Cultivation of six strains of culinary-medicinal Basidiomycete *Pleurotus eryngii* (D.C.) Quél. in the form of submerged culture showed that the yield of their air-dry biomass in non-optimized conditions varied from 11,4 up to 18.0 g/L. Micromorphological features of submerged mycelium strains that are the form of pellets and the presence of clamps on hyphae were studied and characterized. For several *P. eryngii* strains low and moderate antimicrobial activity against Gram-positive (*Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria was found, as well as antifungal activity against filamentous fungus *Aspergillus niger*. All strains were able to produce inhibitors of sterol biosynthesis (ISB) that was demonstrated with the help of bacterial model *Halobacterium salinarum*. The inhibitors of the early steps of sterol biosynthesis, which inhibitory effect on *H. salinarum* growth was dismissed by mevalonate addition, were discovered in the culture broth of some strains, as well as the ability of the other strains

to produce ISB of the late (after mevalonate production) stages. The strains capable to form inhibitors of the late stages of sterol biosynthesis in most cases possess antifungal activity. Obtained results demonstrated that the ability of *P. eryngii* cultures to produce ISB is strain specific. The obtained results allowed to select strains-producers of inhibitors of early and late stages of sterol biosynthesis for further work.

Ключевые слова: ингибиторы биосинтеза стеролов, базидиомицеты, *Pleurotus eryngii*, *Halobacterium salinarum*, ГМГ-КоА редуктаза, ловастатин, мевалонат.

Keywords: inhibitors of sterol biosynthesis, Basidiomycetes, *Pleurotus eryngii*, *Halobacterium salinarum*, HMG-CoA reductase, lovastatin, mevalonate.

Введение

Вешенка степная или королевская *Pleurotus eryngii* (D.C.) Quél. — съедобный культивируемый базидиальный гриб с высокими вкусовыми качествами. В отличие от других видов этого рода *P. eryngii* не является ксилотрофом, растет в ассоциации с представителями семейства зонтичных и включает разновидности, предположительно паразитирующие на растениях. *P. eryngii* образует метаболиты, биологическая активность которых позволяет отнести его к лекарственным грибам, в группу которых входят многие другие базидиомицеты [9]. Установлены противоопухолевые [10; 11], иммуномодулирующие [6], антиоксидантные [12], антибиотические [7] и гиполипидемические [4] свойства метаболитов *P. eryngii*. Возможным объяснением гиполипидемической активности, выявленной в опытах *in vivo*, является обнаружение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в плодовых телах и мицелии *P. eryngii* ловастатина [5].

Ловастатин, хорошо зарекомендовавший себя в медицине для лечения и профилактики атеросклероза, подавляет ранние этапы мевалонатного синтеза холестерина, ингибируя один из его ключевых ферментов — 3-гидрокси-3-

метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) редуктазу. Наряду с ингибиторами ранних этапов биосинтеза стеролов, нередко обладающих гипополипидемическим действием, большое значение для биофармацевтики могут иметь также ингибиторы поздних этапов (после образования мевалоната), проявляющие антифунгальную или противоопухолевую активность [8]. Среди метаболитов *P. eryngii* ингибиторы поздних этапов биосинтеза стеролов обнаружены не были.

Настоящая работа посвящена скринингу штаммов *P. eryngii* — перспективных продуцентов как ранних, так, возможно, и поздних этапов биосинтеза стеролов.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 6 штаммов *P. eryngii* из коллекции ФГБНУ «НИИНА» и кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Штаммы 1, 2, 29 и 88 относились к производственным штаммам, штаммы 3 и 10 — к дикорастущим. Хранение и культивирование исследуемых штаммов, получение этаноловых экстрактов погруженного мицелия и этилацетатных экстрактов фильтрата культуральной жидкости (к.ж.), а также определение антибиотической активности проводили с использованием методов, описанных ранее [1]. Состав жидкой питательной среды для погруженного культивирования был модифицирован за счет увеличения содержания соевой муки до 15 г/л.

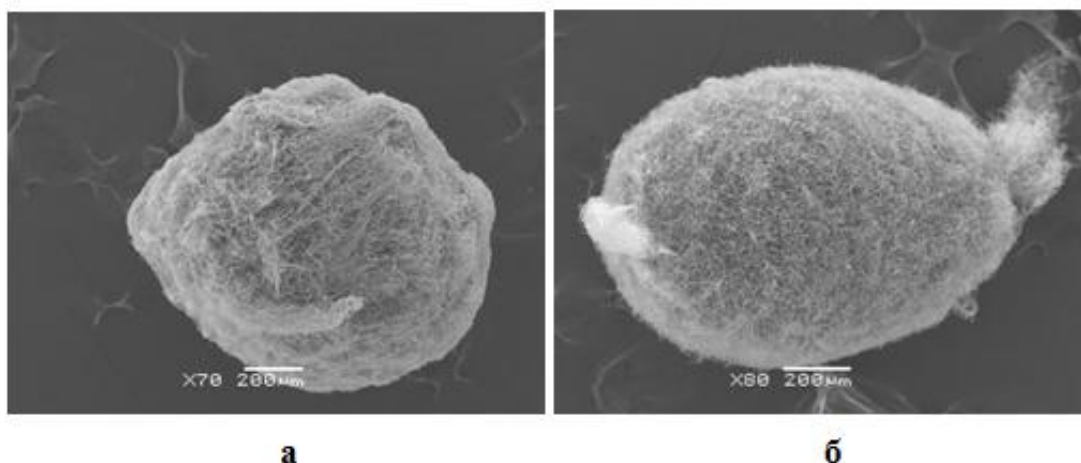
Изучение микроморфологии погруженной культуры штаммов *P. eryngii* проводили методом электронной сканирующей микроскопии с использованием двух приборов: сканирующего микроскопа “JEOL JSM-6380LA” и СЭМ CamScan - S2.

Выявление способности исследуемых штаммов к образованию ингибиторов биосинтеза стеролов (ИБС) проводили в специально разработанном тесте с использованием галофильной бактериальной культуры *Halobacterium salinarum*, обладающей мевалонатным путем биосинтеза стеролов и значительным сходством их биосинтеза с образованием холестерина

в организме человека. ИБС в модели *H. salinarum* выявлялись как соединения, подавляющие рост тест-культуры [2; 3].

Результаты и обсуждение

Накопление погруженной биомассы штаммов *P. eryngii* изучали в течение 6 суток. Максимальное количество биомассы штаммов 2, 29, 3 и 10 было отмечено на 5 сутки культивирования. Штаммы 1 и 88 продолжали накопление биомассы до конца опыта. Наибольший выход погруженной биомассы был отмечен у производственных штаммов 1 и 2, он составил 16,8 и 18,0 г воздушно-сухой биомассы на литр культуральной жидкости соответственно. Наименьшее количество погруженного мицелия образовывал дикорастущий штамм 3, максимальный показатель накопления его биомассы составил 11,4 г/л. Проведенный в дальнейшем поиск штаммов *P. eryngii* — продуцентов ИБС, был проведен с использованием их 5-суточной погруженной культуры.



**Рисунок 1. Электронная микрофотография пеллет *P. eryngii*:
штамм 29 (а) и штамм 88 (б)**

При погруженном культивировании все исследованные штаммы *P. eryngii* росли в виде пеллет шарообразной или эллипсоидной формы (рис. 1). На гифах всех изученных штаммов были отмечены регулярные пряжки (рис. 2), которые являются признаком, подтверждающим принадлежность культур к отделу Basidiomycota, и могут быть использованы для экспресс-оценки аутентичности культуры. Для экспресс-обнаружения пряжек в условиях биотехнологического производства достаточно разрешающей способности световой микроскопии.

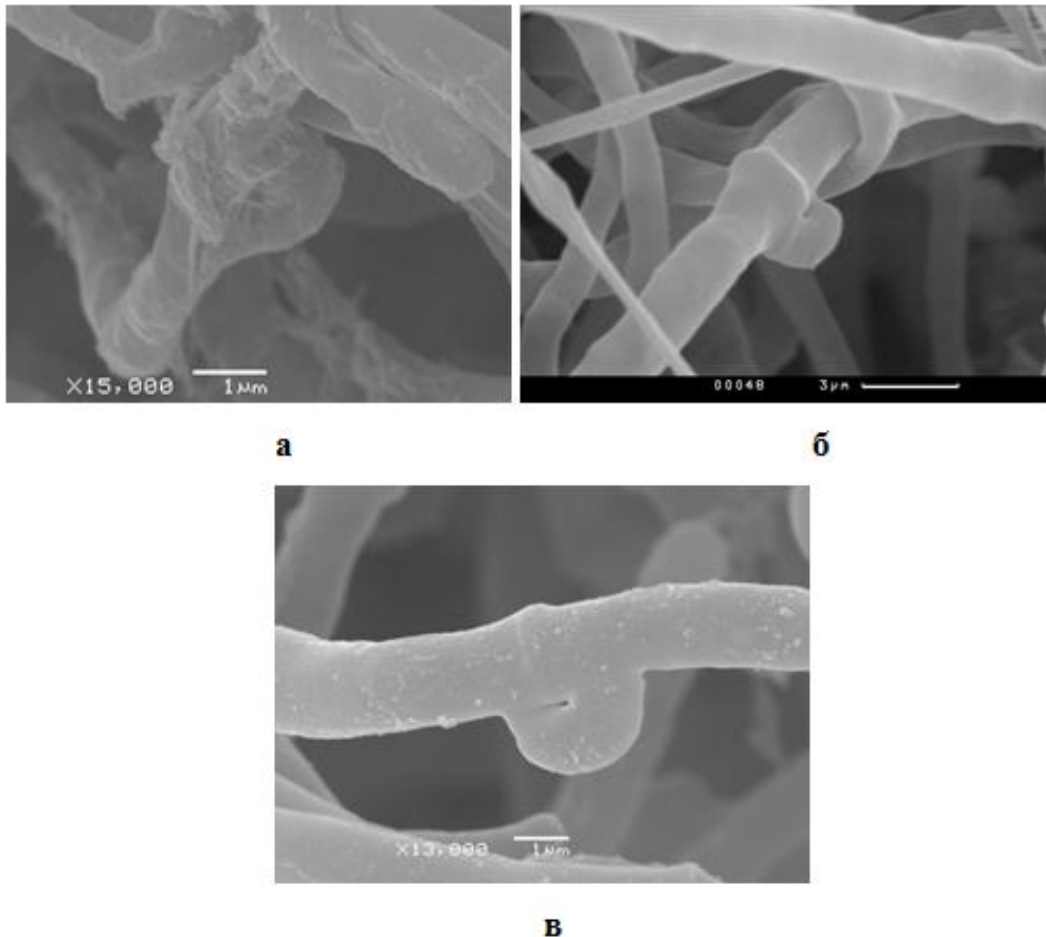


Рисунок 2. Электронная микрофотография гиф и пражек *P. eryngii*: штамм 3 (а), штамм 10 (б), штамм 29 (в)

Изучение антибиотических свойств *P.eryngii* проводили, тестируя действие экстрактов, полученных из погруженного мицелия и к.ж. штаммов продуцента, в отношении различных тест-культур грамположительных (*Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) и грамотрицательных (*Escherichia coli* ATCC 25922) бактерий, дрожжей *Candida albicans* ATCC 14053 и мицелиальных грибов *Aspergillus niger* ATCC 16404. Результаты, представленные в таблице 1, демонстрируют наличие антибактериальной и антифунгальной (в отношении *A. niger*) активности у штаммов 3, 29 и 88, выявленной, главным образом, в экстрактах к.ж. штаммов-продуцентов. У штамма 88 обнаружена также умеренная активность в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli*. Штаммы 1, 2 и 10 в предложенных условиях антибиотических свойств не проявили. Ни один из испытанных

штаммов не обнаружил активности в отношении *S. aureus* и дрожжевой культуры *C. albicans*.

Таблица 1.

Антибиотическая активность экстрактов, полученных из культуральной жидкости и мицелия различных штаммов *P. eryngii*

Штамм	Материал	МПК*		
		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
1	К.ж.	0	0	0
	Мицелий	0	0	0
2	К.ж.	0	0	0
	Мицелий	0	0	0
3	К.ж.	2×10^{-1}	0	5×10^{-2}
	Мицелий	0	0	5×10^{-2}
10	К.ж.	0	0	0
	Мицелий	0	0	0
29	К.ж.	1	0	2×10^{-1}
	Мицелий	0	0	0
88	К.ж.	2×10^{-1}	5×10^{-2}	2×10^{-1}
	Мицелий	0	0	0

* МПК — минимальная подавляющая концентрация, в единицах разведения культуральной жидкости; получена методом диффузии в агар и методом серийных разведений;

0 — отсутствие активности.

Активность в отношении грибной культуры *A. niger* продемонстрировали штаммы 3, 29 и 88, причем антифунгальное действие штамма 3, отличающегося более высокой активностью, было выявлено также в мицелии продуцента.

Эксперименты с использованием микробной модели *H. salinarum*, разработанной нами для отбора ИБС [2; 3], показали, что экстракты, полученные из к.ж. и мицелия отдельных штаммов *P.eryngii*, способны к полному (МПК-1) или частичному (МПК-2) подавлению роста этой тест-культуры (табл. 2). Такое подавление, наблюдавшееся при использовании экстрактов, взятых в весьма незначительной концентрации (10^{-2} — 10^{-3} ед.к.ж.), соответствующей разведению находящихся в них микробных метаболитов по сравнению с исходной к.ж. в 100 — 1000 раз, свидетельствовало о наличии в них биологически активных соединений — ИБС.

Таблица 2.

Активность экстрактов, полученных из погруженной культуры штаммов *P. eryngii*, в отношении микробной культуры *H. salinarum* в сравнении с ловастатином

Штамм	Материал	МПК (ед.к.ж.)		Снятие ингибирующего действия при добавлении мевалоновой кислоты
		МПК-1 ¹⁾	МПК-2 ²⁾	
1	К.ж.	3×10^{-1}	10^{-2}	-
	Мицелий	$>3 \times 10^{-1}$	5×10^{-2}	-
2	К.ж.	3×10^{-1} ($>3 \times 10^{-1}$)	3×10^{-3} ($1,5 \times 10^{-2}$)	+
	Мицелий	$>3 \times 10^{-1}$	5×10^{-3}	-
3	К.ж.	10^{-1}	10^{-2}	-
	Мицелий	10^{-1}	3×10^{-2}	-
10	К.ж.	10^{-2} (3×10^{-1})	$1,5 \times 10^{-3}$ (10^{-2})	+
	Мицелий	3×10^{-1}	3×10^{-3}	-
29	К.ж.	3×10^{-1}	3×10^{-2}	-
	Мицелий	10^{-1}	10^{-2}	-
88	К.ж.	3×10^{-1}	$1,5 \times 10^{-2}$	-
	Мицелий	10^{-1}	10^{-2}	-
Ловастатин ⁴⁾		3 (16)	0,3 (3,0)	+

¹⁾ МПК-1 — определена как минимальная концентрация препарата, полностью предотвращающая рост тест-культуры

²⁾ МПК-2 — определена как минимальная концентрация препарата, при которой происходит подавление роста на 50 %.

³⁾ В скобках показаны значения, полученные при добавлении препарата мевалоновой кислоты (3 мМ) в случае, если наблюдалось изменение МПК

⁴⁾ МПК (в мкг/мл)

К полному или частичному подавлению роста тест-культуры *H. salinarum* оказались способны экстракты, полученные из к.ж. и мицелия большинства изученных штаммов, однако наибольшим подавляющим эффектом обладали экстракты к.ж. штаммов 2, 3 и 10. Экстракты штаммов 3 и 10 были способны также к лизису тест-культуры, характерному для действия ряда ИБС [8].

При внесении в среду культивирования *H. salinarum* экзогенной мевалоновой кислоты (3 мМ) наблюдалось резкое снижение подавляющего действия экстрактов к.ж. штаммов 2 и 10. Аналогичный защитный эффект

мевалоната имел место при изучении ловастатина, являющегося ингибитором ранних этапов биосинтеза стеролов, взятого нами в качестве препарата сравнения. Выявленное сходство позволяет сделать вывод о том, что антибиотический комплекс, выделяемый из к.ж. штаммов 2 и 10, содержит ингибиторы ранних этапов биосинтеза стеролов. Следует отметить, что выявляемые ингибиторы ранних этапов биосинтеза стеролов находились только в к.ж., но не в мицелии этих штаммов.

Поскольку внесение в инкубационную среду *H. salinarum* мевалоновой кислоты не снимало подавляющего действия других тестируемых препаратов (экстракты, полученные из к.ж. и мицелия штаммов 1, 3, 29 и 88), их нельзя отнести к ингибиторам ранних этапов биосинтеза стеролов. Возможно, они являются ингибиторами более поздних (после образования мевалоната) этапов биосинтеза стеролов, среди которых велика вероятность обнаружения антибиотиков, обладающих антифунгальным действием [8]. В пользу такого предположения свидетельствует обнаружение именно у этих штаммов *P. eryngii* (3, 29 и 88) антифунгальной активности (табл. 1).

Выявление метаболитов, подавляющих ранние этапы биосинтеза стеролов, лишь у отдельных штаммов испытанных культур свидетельствует о том, что способность базидиомицетов к образованию ИБС является штаммоспецифической.

Таким образом, проведенная работа позволила отобрать для дальнейших детальных исследований штаммы *P. eryngii*, предположительно способные к образованию ингибиторов как ранних, так и поздних этапов биосинтеза стеролов.

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук, профессору Л.В. Гарибовой за научно-консультационную помощь и кандидату химических наук А. Тюрину за методическое сопровождение работ по получению экстрактов *P. eryngii*.

Список литературы:

1. Краснопольская Л.М., Белицкий И.В., Федорова Г.Б. и др. *Pleurotus djamor*: способы культивирования и антимикробные свойства // Микол. Фитопатол. — 2001. — Т. 35. — В. 1. — С. 62—67.
2. Тренин А.С. Микробная модель *Halobacterium salinarum* для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов // Антибиотики и химиотерапия. — 2013а. — Т. 58. — № 5—6. — С. 3—10.
3. Тренин А.С. Микробные модели в поиске ингибиторов биосинтеза стеролов // Антибиотики и химиотерапия. — 2013б. — Т. 58. — № 7—8. — С. 3—14.
4. Alam N, Yoon K.N, Lee J.S. Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on function and histology in hypercholesterolemic rats // Saudi J Biol. Sci. — 2011. — V. 18. — P. 403—409.
5. Chen S-Y., Ho K-J., Hsieh Y-J. Content of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia // Food Sci. Technol. — 2012. — V. 47. — P. 274—288.
6. Ike K., Kameyama N., Ito A. et al. Induction of a T-Helper 1 (Th1) immune response in mice by an extract from the *Pleurotus eryngii* (Eringi) mushroom // J. Med. Food. — 2012. — I. 12. — P. 1124—1128.
7. Schillaci D., Arizza V., Gargano M.L. et al. Antibacterial activity of Mediterranean Oyster mushrooms, species of genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) // Int. J. Med. Mushrooms. — 2013. — V. 15. — N 6. — P. 591—594.
8. Trenin A.S. Microbial metabolites inhibiting sterol biosynthesis: Their chemical diversity and characteristics of the mechanism of action // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2013с. — V. 39. — N. 6. — P. 565—587.
9. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges // Biomedical Journal. — 2014. — V. 37. — I. 6. — P. 345—356.

10. Xue Z., Li J., Cheng A. et al. Structure identification of triterpene from the mushroom *Pleurotus eryngii* with inhibitory effects against breast cancer // *Plant Foods Hum. Nutr.* — 2015. — V. 70. — N. 3. — P. 291—296.
11. Yang Z., Xu J., Fu Q. et al. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. // *Carbohydr. Polym.* — 2013. — V. 95. — I. 2. — P. 615—620.
12. Zhang A., Li X., Xing C. et al. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2014. — V. 65. — P. 28—32.

References:

1. Krasnopolskaya L.M., Belitski I.V., Feodorova G.B., Katrucha G.S. *Pleurotus djamor*: the methods of cultivation and antimicrobial properties. *Mikol. Fitopatol* [Mikol. Fitopatol.]. 2001, Vol. 35, I. 1, pp. 62—67. (In Russian).
2. Trenin A.S. Microbial model *Halobacterium salinarum* for searching sterol biosynthesis inhibitors. *Antibiotiki i khimioterapiia* [Antibiotics and chemotherapy]. 2013, Vol. 58, no. 5—6, pp. 3—10. (In Russian).
3. Trenin A.S. Microbial models in screening of inhibitors of sterol biosynthesis. *Antibiotiki i khimioterapiia* [Antibiotics and chemotherapy]. 2013, Vol. 58, no. 7—8, pp. 3—14. (In Russian).
4. Alam N., Yoon K.N., Lee J.S. Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on function and histology in hypercholesterolemic rats. *Saudi J Biol. Sci.* 2011. V. 18. P. 403—409.
5. Chen S-Y., Ho K-J., Hsieh Y-J. Content of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *Food Sci. Technol.* 2012. V. 47. P. 274—728.
6. Ike K., Kameyama N., Ito A, Imai S. Induction of a T-Helper 1 (Th1) immune response in mice by an extract from the *Pleurotus eryngii* (Eringi) mushroom. *J. Med. Food.* 2012. I. 12. P. 1124—1128.

7. Schillaci D., Arizza V., Gargano M.L., Venturella G. Antibacterial activity of Mediterranean Oyster mushrooms, species of genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*. 2013. V. 15. N. 6. P. 591—594.
8. Trenin A.S. Microbial metabolites inhibiting sterol biosynthesis: Their chemical diversity and characteristics of the mechanism of action. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2013. V. 39. N. 6. P. 565—587.
9. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal*. 2014. V. 37. I. 6. P. 345—356.
10. Xue Z., Li J., Cheng A., Yu W., Zhang Z., Kou X., Zhou F. Structure identification of triterpene from the mushroom *Pleurotus eryngii* with inhibitory effects against breast cancer. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2015. V. 70. N. 3. P. 291—296.
11. Yang Z., Xu J., Fu Q., Fu X., Shu T., Bi Y., Song B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 95. I. 2. P. 615—620.
12. Zhang A., Li X., Xing C., Yang J., Sun P. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. V. 65. P. 28—32.