

УДК 582.284:543.062:578.832:578.825

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАННОГО МИЦЕЛИЯ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩЕГО БАЗИДИОМИЦЕТА *FOMES FOMENTARIUS* (L.) FR.

© М.А. Проценко*, Е.И. Филиппова, Т.В. Теплякова, Е.В. Макаревич, О.А. Серова, Н.А. Мазуркова

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 (Россия),
e-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Методом глубинного культивирования получена биомасса мицелия ксилотрофного базидиомицета *Fomes fomentarius* штамма Кр-112. Отмечено, что наибольший выход сухой биомассы (6.9 ± 0.3 г/л) наблюдался при глубинном культивировании в питательной среде с крахмалом и кукурузным экстрактом. Из биомассы культивируемого мицелия гриба получены и охарактеризованы по химическому составу сухие экстракты. Наибольшее содержание суммарного белка (27 ± 1 мг/г), фенольных соединений (13.8 ± 0.5 мг/г) и флавоноидов (13 ± 1 мг/г) выявлено в этанольном экстракте культивируемого мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в глюкозопептонной среде. При этом максимальное содержание полисахаридов (379 ± 16 мг/г) наблюдалось в этанольном экстракте из мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в среде с крахмалом и кукурузным экстрактом. Показано, что экстракты из мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в глюкозопептонной среде, показали самую высокую антиоксидантную активность. Отмечено, что этанольный экстракт, полученный из культивируемого мицелия, выращенного в глюкозопептонной среде, проявлял противовирусную активность *in vitro* в отношении вируса простого герпеса 2-го типа и вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). В опытах *in vivo* при пероральном введении этанольного экстракта мицелия, выращенного в глюкозопептонной среде, мышам, инфицированным вирусом гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), в профилактической схеме коэффициент защиты животных составил 60%.

Ключевые слова: *Fomes fomentarius*, культивируемый мицелий, экстракты, антиоксидантная активность, противовирусная активность *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Введение

Еще во времена Гиппократы трутовика использовали как материал для кровоостанавливающих повязок. Европейские хирурги и дантисты использовали их в этом качестве вплоть до XIX столетия. В Китае отваром *Fomes fomentarius* (L.) Fr. лечили рак пищевода, желудка и матки. Водный экстракт гриба нормализует уровень глюкозы в крови и липидный обмен, а также снижает активность ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, стимулирует тканевое дыхание [1], а этанольный экстракт гриба проявляет железо-восстанавливающую способность [2].

Проценко Мария Анатольевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Филиппова Екатерина Игоревна – научный сотрудник,
e-mail: filippova_ei@vector.nsc.ru

Теплякова Тамара Владимировна – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией микологии,
e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

Макаревич Елена Викторовна – научный сотрудник,
e-mail: makarevich_ev@vector.nsc.ru

Серова Ольга Алексеевна – научный сотрудник,
e-mail: serova_oa@vector.nsc.ru

Мазуркова Наталья Алексеевна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией препаратов природного происхождения, e-mail: mazurkova@vector.nsc.ru

Выявлена также и противовирусная активность мицелия *Fomes fomentarius* в отношении вируса гриппа А субтипа H1N1 [3].

Достижения в области биотехнологии привели к созданию культивируемых штаммов многих базидиальных грибов, в том числе *Fomes fomentarius*. В Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора сотрудниками лаборатории микологии депонирован штамм *Fomes fomentarius* Кр-112. Мицелиальная биомасса грибов, полученная биотехно-

* Автор, с которым следует вести переписку.

логическими методами, имеет преимущество перед плодовыми телами в связи с возможностью влиять на выход фармакологически активных соединений и качество конечного продукта, варьируя состав питательных сред и условий выращивания [4]. Однако стоимость единицы культивируемого мицелия несколько выше стоимости плодового тела. Кроме того, в составе комплекса синтезируемых метаболитов плодовых тел и культивируемого мицелия часто наблюдаются различия как качественного, так и количественного состава. Это связано с тем, что на биосинтез метаболитов в грибной клетке значительное влияние оказывает окружающая среда. По сравнению с лесными плодовыми телами, которые могут содержать недопустимые количества тяжелых металлов и мышьяка, культивируемый мицелий является безопасным сырьем [5].

Целью настоящей работы является подбор оптимальных питательных сред для глубинного культивирования мицелия дереворазрушающего гриба *Fomes fomentarius*, анализ химического состава и биологической активности экстракционных препаратов, полученных из выращенного мицелия гриба.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали штамм Кр-112 *Fomes fomentarius* из Коллекции вирусов, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Штамм депонирован в Коллекции под номером F-1261, выделен в чистую культуру из плодовых тел гриба, снятого с пня тополя, в Новосибирской области, в Чановском районе, в санатории Карачи в феврале 2011 года. Хранение штаммов осуществляли на скошенном агаре при температуре 2–4 °С в условиях холодильника.

Для глубинного культивирования *Fomes fomentarius* использовали питательные среды состава:

1) глюкоза – 30.0 г/л; пептон – 5.0 г/л; дрожжевой экстракт – 2.0 г/л; дигидрофосфат калия – 1.0 г/л; сульфат магния – 0.5 г/л (ГПС);

2) меласса – 40 г/л; кукурузный экстракт – 15 г/л; дигидрофосфат калия – 1 г/л; сульфат магния – 0.3 г/л (МКС);

3) крахмал – 45 г/л, кукурузный экстракт – 15 г/л, дигидрофосфат калия – 0.5 г/л, гидрофосфат калия – 0.5 г/л, сульфат магния – 0.25 г/л (ККЭС) [6].

Для твердофазного культивирования использовали питательные среды с тем же составом, но с добавлением 2% агара. Значение pH используемых сред составляло 6.0±0.5.

Наработку посевного твердофазного мицелия осуществляли на агаризованных питательных средах во флаконах емкостью 500 мл. По истечении 7 суток рассекали питательные среды с молодым мицелием иглой и добавляли во флаконы по 80 мл жидкой питательной среды с тем же составом, но без агара. Посевной мицелий на жидких средах нарабатывали в течение 3 суток на ротационных качалках со скоростью вращения 190 об./мин и температуре 26±2 °С.

Процесс погруженного культивирования мицелия гриба проводили в колбах вместимостью 500 мл в 100 мл питательной среды на ротационной качалке при скорости вращения 190 об./мин, температуре 26±2 °С в течение 5–7 суток. Для засева жидких сред использовали 3-суточный инокулят глубинной культуры в качестве посевного материала в объеме 20%. По окончании культивирования мицелиальную биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, затем промывали ее дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С. Высушенный мицелий измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, измеряли массу сухого мицелия и рассчитывали содержание сухой биомассы культивируемого мицелия.

Подготовка сухих экстрактов из культивируемого мицелия: этанольные экстракты получали четырехкратной экстракцией 70% этиловым спиртом при температуре 60 °С и соотношении сырья к экстрагенту 1 : 50. Общее время экстракции 70% этанолом составляло 4 ч. Водные экстракты получали двукратной экстракцией дистиллированной водой при температуре 95 °С в течение 2 ч. Охлажденные жидкие извлечения отфильтровывали от сырья, упаривали и досушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С до влажности 5% [7].

Количественный анализ белков, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в сухих экстрактах проводили с использованием разработанных нами ранее экспресс-методик, позволяющих использовать малые объемы исследуемых проб и реактивов и проводить анализы для нескольких десятков образцов [7].

Содержание белка в образцах определяли методом Бредфорда, полисахариды анализировали методом Дрейвуда в модификации, флавоноидов – по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия, фенольных соединений – по окислительно-восстановительной реакции Фолина-Чикольте.

Метод Бредфорда основан на реакции красителя Кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250) с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при 595 нм [8]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Модифицированный антроновый метод Дрейвуда включает кислотный гидролиз полисахаридов серной кислотой с получением моносахаридов, образующих с антроном окрашенные комплексы сине-зеленого цвета с максимумом спектра поглощения при 520–625 нм. При разбавлении реакционной смеси этиловым спиртом максимум спектра поглощения смещается до 430 нм [9]. Определение содержания полисахаридов проводят в пересчете на глюкозу, используя предварительно построенный калибровочный график зависимости величины оптической плотности глюкозы ($\lambda=430$ нм) от концентрации.

Метод Фолина-Чикольте основан на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота. Интенсивность появляющейся синей окраски зависит от концентрации восстановителя [10]. В качестве стандарта использовали галловую кислоту.

Фотоколориметрические методы анализа, основанные на реакции комплексообразования флавоноидов с солями металлов, проявляют высокую специфичность по отношению к флавоноидам. При этом образуются окрашенные соединения, имеющие флуоресценцию, и наблюдается батохромный сдвиг [11]. Содержание флавоноидов определяли в пересчете на дигидрокверцетин.

Очистка этанольного экстракта. 100 мг этанольного экстракта мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного глубинным способом в ГПС, растворяли в 20 мл 0.9% раствора хлорида натрия при температуре 25–30 °С в течение 2 ч. Раствор отделяли от осадка центрифугированием. К раствору прибавляли 4М раствор сульфата аммония в соотношении 1 : 2. Смесь оставляли в холодильнике на 1–3 суток при 4–6 °С. Осадок отделяли от супернатанта центрифугированием и растворяли в воде. Раствор диализовали против дистиллированной воды, а затем высушивали [12, 13]. Контроль завершенности процесса диализа проводился с помощью характерной реакции на ион сульфата с хлоридом бария. Так был получен образец, содержащий преимущественно сумму белков и полисахаридов.

Для получения суммы фенольных соединений, в том числе флавоноидов, 100 мг того же этанольного экстракта растворяли в 20 мл этилацетата при температуре 25–30 °С в течение 1 суток. Раствор отделяли от осадка центрифугированием, супернатант высушивали до удаления органического растворителя [14, 15].

Анализ антиоксидантной активности грибных экстрактов осуществляли по ингибированию железозаскорбатиндуцированного окисления твина-80 до малонового диальдегида. При взаимодействии малонового диальдегида с 2-тиобарбитуровой кислотой образовывался триметиновый комплекс, окрашенный в розовый цвет, имеющий максимум поглощения при длине волны 532 нм [16]. В качестве препаратов сравнения использовали кислоту галловую и дигидрокверцетин. Для анализа антиоксидантной активности экстракты и препараты сравнения растворяли в воде дистиллированной.

Анализ токсичности экстрактов проводили на клеточных линиях Vero (клетках почки взрослой африканской зеленой марышки) и MDCK (клетках почки собаки кокер-спаниеля), полученных из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Определяли максимально переносимые концентрации образцов препаратов для данных культур клеток [17].

Тестирование противогерпетической активности проводили на перевиваемой культуре клеток Vero, выращенной в 96-луночных планшетах. В работе использовали вирус простого герпеса 1-го (штамм VR-3) и 2-го типа (штамм MS). Для определения противовирусной активности образцов в монослой культуры клеток Vero вносили по 50 мкл/лунку грибного экстракта в его максимально переносимой концентрации для этой клеточной культуры и разведенной от 10 до 10⁸ раз вирусосодержащей культуральной жидкости. Клетки инкубировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 72 ч в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие в монослое клеток. Определяли титры вируса в Ig ТЦД₅₀/мл (десятичных логарифмах 50%-х тканевых цитопатических доз в мл) в контроле и в опыте по методу Рида и Менча [18] и высчитывали индекс нейтрализации (ИН) вируса под влиянием экстрактов:

$$\text{ИН} = \text{Титр вируса контроль} - \text{Титр вируса опыт (lg)}.$$

Тестирование противовирусной активности экстрактов *Fomes fomentarius* проводили в перевиваемой культуре клеток MDCK и на аутбредных мышах популяции ICR массой 14–16 г, полученных из Питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В работе использовали вирус гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и адаптированный к лабораторным мышам вирус гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из Коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В конце экспериментов мышей подвергали эвтаназии в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [19].

В экспериментах *in vitro* противовирусную активность экстрактов *Fomes fomentarius* определяли по их способности ингибировать инфекционность (титр) вируса гриппа в зараженных клетках в сравнении с таковой в контрольной инфицированной культуре (без экстракта). Для этого в монослой культуры клеток MDCK вносили экстракт в его максимально переносимой концентрации для этой клеточной культуры и разведенную от 10 до 10^8 раз вирусосодержащую культуральную жидкость. Клетки инкубировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 48 ч после заражения клеток вирусом гриппа и обработки их образцами экстрактов в каждой лунке планшета с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие в монослое клеток и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации с 1%-й суспензией эритроцитов кур [17]. Титры вируса гриппа в контроле и опыте, а также ИН определяли, как описано в разделе «*Тестирование противогерпетической активности*».

В опытах *in vivo* использовали профилактическую схему: в первый день препарат *Fomes fomentarius* вводили перорально мышам (по 200 мкл/мышь в концентрации 6 мг/мл) за час до и через 1 ч после заражения вирусом гриппа А/Н3N2 в дозе 10 ЛД₅₀ (50%-х летальных доз) (ЛД₅₀ определяли, как описано в [20]), далее препараты вводили 2 раза в сутки в течение 4 суток. За животными наблюдали в течение 16 суток. Высчитывали процент выживаемости животных в опыте и контроле. Коэффициент защиты (КЗ) высчитывали по формуле

$$\text{КЗ} = \% \text{ гибели мышей в контроле} - \% \text{ гибели мышей в опыте.}$$

При определении средней продолжительности жизни (СПЖ) в каждой группе учитывали число мышей, проживших определенное количество дней после заражения до гибели, и число выживших животных. За максимальный срок жизни выживших животных принимали 16 суток.

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) с оценкой достоверности отличий при $p \leq 0.05$. Сравнение титров вируса в контроле и опыте проводили по t-критерию Стьюдента, сравнение количества выживших мышей в инфицированных группах под действием экстрактов *Fomes fomentarius* с таковыми в контрольных группах животных проводили по Chi-square критерию, а СПЖ животных опытных и контрольных групп сравнивали по U-критерию Манна-Уитни [21, 22].

Обсуждение результатов

В условиях глубинного культивирования на круговых качалках получена биомасса мицелия на основе штамма *Fomes fomentarius* Кр-112. Отмечено, что выход сухой биомассы мицелия гриба при культивировании на ГПС составил 3.8 ± 0.2 г/л, на ККЭС – 6.9 ± 0.3 г/л, а на МКС – 2.1 ± 0.1 г/л.

Из биомассы культивируемого мицелия гриба *Fomes fomentarius* получены образцы препаратов в виде сухих этанольных и водных экстрактов. Наибольший выход этанольного экстракта наблюдался у мицелия, выращенного в ГПС, водного – у мицелия, выращенного в среде с крахмалом и кукурузным экстрактом (табл. 1).

Полученные сухие препараты анализировали на содержание в них суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов. Выявлено, что наибольшее содержание суммарного белка (27 ± 1 мг/г), фенольных соединений (13.8 ± 0.5 мг/г) и флавоноидов (13 ± 1 мг/г) наблюдается в этанольном экстракте культивируемого мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в ГПС. Максимальное содержание полисахаридов (379 ± 16 мг/г) наблюдается в этанольном экстракте мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в ККЭС (табл. 1).

При определении биологической активности экстрактов из мицелия *Fomes fomentarius* выявлено, что экстракты из мицелия гриба, выращенного в ГПС, показали самую высокую антиоксидантную активность в реакции окисления Твин-80 кислородом, сопоставимую с активностью препаратов сравнения (табл. 2).

Следует отметить, что эти экстракты показали более высокое содержание фенольных соединений и флавоноидов по сравнению с экстрактами, полученными из мицелия, выращенного на других питательных средах (табл. 1).

В дальнейшем этанольные и водные экстракты, полученные из культивируемого мицелия базидиомицета *Fomes fomentarius*, были тестированы на токсичность и противовирусную активность в отношении вирусов простого герпеса и гриппа А в культурах клеток Vero и MDCK соответственно. Результаты исследования представлены в таблицах 3 и 4.

Вирусингибирующая активность в культуре клеток Vero в отношении вируса простого герпеса 2-го типа наблюдалась только у этанольных экстрактов мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в МКС и в ГПС. При этом ни один из экстрактов не проявлял активность в отношении вируса простого герпеса 1-го типа. Индекс нейтрализации вируса простого герпеса 2-го типа под действием этанольных экстрактов составлял от 1.5 до 2.0 lg (табл. 3).

Показано, что из всех исследуемых образцов только этанольный экстракт, полученный из культивируемого мицелия, выращенного в ГПС, проявил заметный противогриппозный эффект в культуре клеток MDCK, судя по достоверному снижению титров вируса в его присутствии. Индекс нейтрализации вируса гриппа птиц субтипа H5N1 под действием этого экстракта составил 2.0 lg (табл. 4). Следует отметить, что этот же экстракт обладал самой высокой антиоксидантной активностью среди других этанольных экстрактов (табл. 2). В данном экстракте выявлено наибольшее содержание суммарного белка, фенольных соединений и флавоноидов (табл. 1). Однако, очищенные фракции этого экстракта показали достоверное снижение титра вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2), но не штамма A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1) (табл. 5). При этом более высокую вирусингибирующую активность проявил очищенный экстракт, содержащий преимущественно сумму фенольных соединений.

Исходя из полученных экспериментальных данных, можно предположить, что на противовирусную активность *in vitro* этанольного экстракта мицелия, культивированного в ГПС, в отношении вируса гриппа штамма A/chicken/ Kurgan/05/2005 оказывают влияние несколько групп БАВ.

Таблица 1. Характеристика экстрактов *Fomes fomentarius* по химическому составу и выходу экстрактивных веществ

Наименование препарата	Питательная среда	Выход экстрактивных веществ, %	Сб, мг/г (M±m) (n=4)	Спс, мг/г (M±m) (n=4)	Сфс, мг/г (M±m) (n=4)	Сфл, мг/г (M±m) (n=4)
Этанольный экстракт	ГПС	32	27±1	74±16	13.8±0.5	13±1
	МКС	23	8±0	182±10	3.2±0.3	9±1
	ККЭС	16	≤5	379±16	≤1.8	8±1
Водный экстракт	ГПС	17	7±0	123±27	12.2±1.1	9±1
	МКС	19	15±1	129±9	6.5±0.3	≤5
	ККЭС	30	≤5	239±18	≤1.8	≤5

Примечание. Сб – содержание белка; Спс – содержание полисахаридов; Сфс – содержание фенольных соединений; Сфл – содержание флавоноидов; М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов.

Таблица 2. Результаты анализа антиоксидантной активности экстрактов *Fomes fomentarius*

Наименование препарата	Питательная среда	Концентрация, мг/мл	АОА, % (M±m)(n=4)
Этанольный экстракт	ГПС	5.0	22±7*
	МКС	5.0	10±3* [@]
	ККЭС	5.0	7±4* [@]
Водный экстракт	ГПС	5.0	29±4
	МКС	5.0	12±1* [@]
	ККЭС	5.0	10±5* [@]
Дигидрокверцетин		0.5	41±1
Кислота галловая		5.0	31±5

Примечание. АОА – антиоксидантная активность; М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; * – достоверное отличие от показателя антиоксидантной активности дигидрокверцетина при p≤0.05; [@] – достоверное отличие от показателя антиоксидантной активности кислоты галловой при p≤0.05.

Таблица 3. Противовирусная активность экстрактов *Fomes fomentarius* в культуре клеток Vero в отношении вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов

Наименование препарата	Питательная среда	МПК, мг/мл	ВПГ-1		ВПГ-2	
			lgТЦД ₅₀ /мл ± Sm	ИН, lg	lgТЦД ₅₀ /мл ± Sm	ИН, lg
Этанольный экстракт	ГПС	0.25	9.50±0.00	0.00	1.50±0.00*	2.00
	МКС	0.25	9.50±0.00	0.00	1.50±0.00*	2.00
	ККЭС	0.5	9.50±0.00	0.00	2.00±0.29*	1.50
Водный экстракт	ГПС	2.5	9.50±0.00	0.00	3.50±0.00	0.00
	МКС	1.25	9.50±0.00	0.00	3.50±0.00	0.00
	ККЭС	2.5	9.50±0.00	0.00	3.50±0.00	0.00
Контроль вируса простого герпеса		–	9.50±0.00	–	3.50±0.00	–

Примечание. ВПГ-1, ВПГ-2 – вирус простого герпеса 1- и 2-го типа; МПК – максимально переносимая концентрация; lgТЦД₅₀/мл – десятичный логарифм 50% тканевой цитопатической дозы; Sm – стандартное отклонение; ИН – индекс нейтрализации; * – достоверное отличие от соответствующего контроля при p≤0.05.

Таблица 4. Противовирусная активность экстрактов *Fomes fomentarius* в культуре клеток MDCK в отношении штаммов вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1)

Наименование препарата	Питательная среда	МПК, мг/мл	A/Aichi/2/68 (H3N2)		A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1)	
			lgТЦД ₅₀ /мл ± Sm	ИН, lg	lgТЦД ₅₀ /мл ± Sm	ИН, lg
Этанольный экстракт	ГПС	2.5	5.50±0.00	0.50	3.75±0.35*	2.00
	МКС	0.5	6.50±0.00	-0.50	5.00±0.29	0.75
	ККЭС	1.25	6.50±0.00	-0.50	5.50±0.00	0.25
Водный экстракт	ГПС	0.5	5.50±0.00	0.50	6.00±0.29	-0.25
	МКС	0.1	6.00±0.29	0.00	6.00±0.29	-0.25
	ККЭС	0.5	5.50±0.00	0.50	5.50±0.00	0.25
Контроль вируса гриппа		–	6.00±0.29	–	5.75±0.25	–

Примечание. МПК – максимально переносимая концентрация; lgТЦД₅₀/мл – десятичный логарифм 50% тканевой цитопатической дозы; Sm – стандартное отклонение; ИН – индекс нейтрализации; * – достоверное отличие от соответствующего контроля при p≤0.05.

Таблица 5. Противогриппозная активность очищенных экстрактов мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в ГПС, в культуре клеток MDCK в отношении штаммов A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1)

Наименование препарата	МПК, мг/мл	A/Aichi/2/68 (H3N2)		A/chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1)	
		lgТЦД ₅₀ /мл ± Sm	ИН, lg	lgТЦД ₅₀ /мл ± Sm	ИН, lg
Фенольно-флавоноидная фракция	0.5	2.00±0.29*	4.00	5.00±0.29	0.00
Контроль вируса гриппа	–	6.00±0.29	–	5.00±0.29	–
Белково-полисахаридная фракция	0.55	4.00±0.29*	1.75	3.50±0.00	0.75
Контроль вируса гриппа	–	5.75±0.25	–	4.25±0.25	–

Примечание. МПК – максимально переносимая концентрация; lgТЦД₅₀/мл – десятичный логарифм 50% тканевой цитопатической дозы; Sm – стандартное отклонение; ИН – индекс нейтрализации; * – достоверное отличие от соответствующего контроля при p≤0.05.

Изучение противовирусной активности *in vivo* этанольного экстракта из мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в ГПС, в отношении штамма A/Aichi/2/68 (H3N2), показало, что введение мышам образца экстракта до заражения вирусом гриппа и после заражения в течение 5 суток вызывало их значительную защиту по сравнению с контрольными животными (без введения препаратов). Так, при введении грибного экстракта выживаемость мышей составила 80%, коэффициент защиты – 60%, а средняя продолжительность их жизни – 14.8±2.5 суток, тогда как в контрольной группе животных (без введения препаратов) выживаемость и СПЖ мышей составили 20% и 10.5±3.7 суток соответственно (табл. 6). Следует отметить, что этот экстракт не проявлял заметного вирусингибирующего эффекта в отношении данного штамма вируса гриппа в культуре клеток MDCK (табл. 4). При этом, как было отмечено выше, очищенные фракции этого экстракта показали достоверное снижение титров вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в культуре клеток MDCK. Исходя из этого, можно предположить, что фенольные соединения больше остальных влияют на противовирусную активность.

Таблица 6. Противовирусная активность этанольного экстракта мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в ГПС, в отношении штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в опытах на мышах

Наименование препарата	Содержание сухого вещества препарата, мкг/г массы мыши	Показатели выживаемости мышей при инфицировании 10 ЛД ₅₀ вируса гриппа		
		Кол-во (% выживших)	КЗ, %	СПЖ (M±Sm), сут
Экстракт <i>Fomes fomentarius</i> (n=10)	160	8 (80%)**	60	14.8±2.5*
Тамифлю (n=10)	10	9 (90%)**	70	15.4±1.9*
Римантадин (n=10)	10	9 (90%)**	70	15.4±1.9*
Контроль (без препарата) (n=10)	–	2 (20%)	–	10.5±3.7

Примечание. M – среднее арифметическое значение; Sm – стандартное отклонение; КЗ – коэффициент защиты; СПЖ – средняя продолжительность жизни (за максимальный срок жизни животных принимали 16 сут); ** – отличие от контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0.05$; * – отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0.05$.

Выводы

Таким образом, на основе штамма *Fomes fomentarius* Кр-112 методами глубинного культивирования получена биомасса мицелия. Из биомассы культивируемого мицелия *Fomes fomentarius* получены и охарактеризованы по химическому составу сухие экстракты. Наибольший выход сухой биомассы гриба наблюдался при глубинном культивировании его в ККЭС, в то время как наибольшую антиоксидантную и противовирусную активность проявляли экстракты из мицелия, выращенного в ГПС.

Результаты исследований, проведенных в настоящей работе, позволяют сделать вывод, что этанольный экстракт, полученный из мицелия *Fomes fomentarius*, культивируемого глубинным способом в ГПС, является перспективным источником для разработки и создания новых эффективных и безопасных противовирусных препаратов.

Список литературы

- Lee J. Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats // Nutrition Research. 2005. Vol. 25. N2. Pp. 187–195. DOI: 10.1016/j.nutres.2005.01.001.
- Ковалева А.В., Кузьминых О.В., Лашенко Е.Ю., Древалъ К.Г., Каниболоцкая Л.В., Бойко М.И., Шендрик А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих макромицетов // Вісник Донецького національного університету. 2013. №1. С. 136–139.
- Круподерова Т.А., Барштейн В.Ю., Рыбалко С.Л. Противовирусная активность мицелия базидиальных грибов в отношении вируса гриппа в экспериментах *in vitro* // Успехи медицинской микологии. 2014. Т. 12. С. 312–314.
- Ковалева Г.К., Громовых Т.И. Биологические свойства и продуктивность нового штамма базидиомицета G.A.-04 *Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pat. // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2008. №1. С. 70–73.
- Скобанев А.В. Ксилотрофные базидиомицеты (Basidiomycota) Пензенской области и накопление тяжелых металлов и мышьяка их базидиомами: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2010. 22 с.
- Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре: монография. Киев, 1988. 144 с.
- Проценко М.А., Костина Н.Е., Теплякова Т.В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer // Биотехнология. 2018. Т. 34. №1. С. 45–51. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-45-51.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. Pp. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Модификация антронового метода количественного определения углеводов и его применение для анализа растительного сырья, содержащего полисахариды // Бюллетень сибирской медицины. 2006. С. 118–119.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // Methods in Enzymology. 1999. Vol. 299. Pp. 152–178. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)99017-1.
- Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстикова Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск, 2007. 232 с.
- Патент №2524425 С2 (РФ). L-фукоза $\alpha 1 \rightarrow 6$ Специфичный лектин / Ю. Кобаяши, Ю. Хирабаяши, Х. Татено, Х. Кавагиши, Х. Дохра. – 2014.

13. Лебедев Л.Р., Теплякова Т.В., Вязовая Е.А., Даниленко Е.Д. Способ получения экстрактов с противоопухолевой активностью из *Daedaleopsis confragosa* K-1326 // Биотехнология. 2019. Т. 35. №1. С. 68–72. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-68-72.
14. Khushbaktova Z.A., Yusupova S.M., Badal'yants K.L., Syrov V.N., Batirov E.Kh. Isolation of hispidin from a walnut-tree fungus and its antioxidant activity // Chemistry of Natural Compounds. 1996. Vol. 32. Pp. 27–29. DOI: 10.1007/BF01373783.
15. Патент №2530637 С1 (РФ). Способ получения фракции фенольных веществ из чаги / М.А. Сыроева, В.Р. Хабибрахманова, Г.И. Кьямова. – 2014.
16. Федосеева А.А., Лебедкова О.С., Каниболоцкая Л.В., Шендрик А.Н. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. 2008. №3. С. 123–127.
17. Мазуркова Н.А., Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Лобанова И.Е., Высочина Г.И. Высшие растения как основа для разработки противогриппозных препаратов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. №4. С. 55–56.
18. Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating 50% endpoints // American Journal of Epidemiology. 1938. Vol. 27 (3). Pp. 493–497.
19. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Washington: D.C., 1996. 138 с.
20. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962. 180 с.
21. Закс Л. Статистическое оценивание. М., 1976. 598 с.
22. Халафян А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных. 2-е изд. М., 2010. 528 с.

Поступила в редакцию 24 января 2022 г.

После переработки 27 февраля 2022 г.

Принята к публикации 18 марта 2022 г.

Для цитирования: Проценко М.А., Филиппова Е.И., Теплякова Т.В., Макаревич Е.В., Серова О.А., Мазуркова Н.А. Химический состав и биологическая активность культивированного мицелия дереворазрушающего базидиомицета *Fomes fomentarius* (L.) Fr. // Химия растительного сырья. 2022. №3. С. 267–275. DOI: 10.14258/jcrpm.20220310920.

*Prosenko M.A.**, *Filippova E.I.*, *Teplyakova T.V.*, *Makarevich E.V.*, *Serova O.A.*, *Mazurkova N.A.* CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CULTIVATED MYCELIUM OF WOOD-DESTROYING BASIDIOMYCETE *FOMES FOMENTARIUS* (L.) FR.

State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, r.p. Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 (Russia), e-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

The biomass of the mycelium of the xylotrophic basidiomycete *Fomes fomentarius* strain Kr-112 was obtained by submerged cultivation. The highest yield of dry biomass (6.9 ± 0.3 g/l) was observed during submerged cultivation in a nutrient medium with starch and corn extract. Dry extracts were obtained from the biomass of the cultivated mycelium of the fungus and characterized by their chemical composition. The highest content of total protein (27 ± 1 mg/g), phenolic compounds (13.8 ± 0.5 mg/g) and flavonoids (13 ± 1 mg/g) was shown in the ethanol extract of the cultured mycelium *Fomes fomentarius* grown in glucose-peptone medium. The maximum content of polysaccharides (379 ± 16 mg/g) was shown by an ethanol extract from the mycelium of *Fomes fomentarius* grown in a medium with starch and corn extract. Extracts from the mycelium of *Fomes fomentarius* grown in a glucose-peptone medium showed the highest antioxidant activity. An ethanol extract obtained from a cultured mycelium grown in a glucose-peptone medium exhibited antiviral activity *in vitro* against herpes simplex virus type 2 and avian influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). The animal protection factor was 60% in experiments *in vivo* when orally administered ethanol extract of mycelium grown in a glucose-peptone medium in mice infected with the human influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus in the prophylactic scheme.

Keywords: *Fomes fomentarius*, cultured mycelium, extracts, antioxidant activity, antiviral activity *in vitro* and *in vivo*.

* Corresponding author.

References

1. Lee J. Nutrition Research. 2005, vol. 25, no. 2, pp. 187–195. DOI: 10.1016/j.nutres.2005.01.001.
2. Kovaleva A.V., Kuz'minykh O.V., Lashchenko Ye.YU., Dreval' K.G., Kanibolotskaya L.V., Boyko M.I., Shendrik A.N. *Vísnik Donets'kogo natsional'nogo universitetu*, 2013, no. 1, pp. 136–139. (in Russ.).
3. Krupoderova T.A., Barshteyn V.Yu., Rybalko S.L. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*, 2014, vol. 12, pp. 312–314. (in Russ.).
4. Kovaleva G.K., Gromovykh T.I. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2008, no. 1, pp. 70–73. (in Russ.).
5. Skobanev A.V. *Ksilotrofnyye bazidiomitsety (Basidiomycota) Penzenskoy oblasti i nakopleniye tyazhelykh metallov i mysh'yaka ikh bazidiomami: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk.* [Xylotrophic basidiomycetes (Basidiomycota) of the Penza region and the accumulation of heavy metals and arsenic by their basidiomas: author. diss. ... cand. biol. Sciences]. Moscow, 2010, 22 p. (in Russ.).
6. Bukhalo A.S. *Vysshiyе s'yedobnyye bazidiomitsety v chistoy kul'ture: monografiya.* [Higher edible basidiomycetes in pure culture: monograph]. Kiev, 1988, 144 p. (in Russ.).
7. Protsenko M.A., Kostina N.Ye., Teplyakova T.V. *Biotekhnologiya*, 2018, vol. 34, no. 1, pp. 45–51. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-45-51. (in Russ.).
8. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
9. Olennikov D.N., Tankhayeva L.M. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*, 2006, pp. 118–119. (in Russ.).
10. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. *Methods in Enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 152–178. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)99017-1.
11. Korul'kin D.Yu., Abilov Zh.A., Muzychkina R.A., Tolstikov G.A. *Prirodnyye flavonoidy.* [Natural Flavonoids]. Novosibirsk, 2007, 232 p. (in Russ.).
12. Patent 2524425 C2 (RU). 2014. (in Russ.).
13. Lebedev L.R., Teplyakova T.V., Vyazovaya Ye.A., Danilenko Ye.D. *Biotekhnologiya*, 2019, vol. 35, no. 1, pp. 68–72. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-68-72. (in Russ.).
14. Khushbaktova Z.A., Yusupova S.M., Badal'yants K.L., Syrov V.N., Batirov E.Kh. *Chemistry of Natural Compounds*, 1996, vol. 32, pp. 27–29. DOI: 10.1007/BF01373783.
15. Patent 2530637 C1 (RU). 2014. (in Russ.).
16. Fedoseyeva A.A., Lebedkova O.S., Kanibolotskaya L.V., Shendrik A.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2008, no. 3, pp. 123–127. (in Russ.).
17. Mazurkova N.A., Filippova Ye.I., Makarevich Ye.V., Lobanova I.Ye., Vysochina G.I. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*, 2014, no. 4, pp. 55–56. (in Russ.).
18. Reed L.J., Muench H.A. *American Journal of Epidemiology*, 1938, vol. 27 (3), pp. 493–497.
19. *Rukovodstvo po soderzhaniiyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh.* [Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals]. Washington: D.C., 1996, 138 p. (in Russ.).
20. Ashmarin I.P., Vorob'yev A.A. *Statisticheskiye metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh.* [Statistical methods in microbiological research]. Leningrad, 1962, 180 p. (in Russ.).
21. Zaks L. *Statisticheskoye otsenivaniye.* [Statistical estimation]. Moscow, 1976, 598 p. (in Russ.).
22. Khalafyan A.A. *Statistica 6. Statisticheskii analiz dannykh, 2-ye izd.* [Statistica 6. Statistical Data Analysis, 2nd ed.]. Moscow, 2010, 528 p. (in Russ.).

Received January 24, 2022

Revised February 27, 2022

Accepted March 18, 2022

For citing: Prosenko M.A., Filippova E.I., Teplyakova T.V., Makarevich E.V., Serova O.A., Mazurkova N.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 3, pp. 267–275. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20220310920.

