

АУРИКУЛЯРИЯ ГУСТОВОЛОСИСТАЯ – ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Цвирко В.В., Лукашов Р.И.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

cvirkovitalij@yandex.by

Аннотация. Аурикулярия густоволосистая (*Auricularia polytricha*) – базидиальный гриб, произрастающий на стволах и ветвях деревьев и встречающийся в широколиственных лесах тропических регионов мира. В Республике Беларусь его культивируют на искусственных питательных средах в качестве пищевого гриба. Помимо пищевой ценности аурикулярия имеет ряд фармакологических свойств: противовоспалительное, антиоксидантное, противоопухолевое, противоэпилептическое действие. В связи с этим актуально изучение данного гриба как источника биологически активных веществ с антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: аурикулярия густоволосистая, водные и водно-спиртовые извлечения, ВЭЖХ, фенольные соединения, антиоксидантная активность.

Актуальность

В последние годы в Республике Беларусь и странах СНГ наблюдается возрастающий научный интерес к изучению биологически активных веществ (БАВ) в группах высших базидиомицетов, а также к созданию на основе грибов и продуктов их метаболизма пищевых и кормовых добавок, лекарственных препаратов. Одним из перспективных природных источников веществ пищевого и медико-биологического назначения является вид рода *Auricularia* – Аурикулярия густоволосистая, о чем свидетельствуют многочисленные исследования [3-6].

Целью работы является оценка качественного и количественного содержания фенольных соединений (ФС) и антиоксидантной активности (АОА) водных и водно-спиртовых извлечений из аурикулярии густоволосистой, выращенной в естественных условиях и на искусственных питательных субстратах.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись высушенные плодовые тела аурикулярии густоволосистой двух генетически разнородных штаммов 174 и 175, выращенных в естественных условиях и на искусственных субстратах с использованием древесных опилок осины и ольхи. Образцы предоставлены Государственным научным учреждением «Институт леса Национальной академии наук Беларуси» [1]. Высушенное сырье предварительно измельчали до порошка, проходящего сквозь сито с размером отверстий 355 мкм.

Для получения извлечений в качестве экстрагентов использовали воду очищенную и спирт этиловый в объемных долях 40%, 70% и 96%. Водные и водно-спиртовые извлечения получали при соотношении сырья и экстрагента 1 к 50 (0,1 г сырья (точная навеска) на 5,00 мл экстрагента) в течение 60 мин на водяной бане при 80 °С, затем охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и фильтрат использовали для исследований.

Качественный анализ БАВ. Анализ извлечений проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 с насосом на четыре растворителя и устройством для вакуумной дегазации элюента, автосамплером с термостатом, термостатом для колонок с краном переключения, диодно-матричным и флуоресцентным детектором. Обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью компьютерной программы Chromeleon 7.

Идентификацию фенольных соединений проводили путем сопоставления времен удерживания и спектров поглощения веществ в извлечении со стандартными образцами: галловая кислота, кофейная кислота, кверцетин, рутин, кемпферол, кверцетина 3-глюкуронид, мирицетин, лютеолина 7-глюкозид, кемпферола 3-глюкозид, изокверцитрин, гиперозид, дигидрокверцетин и др.

Для определения содержания суммы ФС к 0,100 мл полученного извлечения прибавляли 0,150 мл реактива Фолина–Чокальтеу и 4,75 мл 10% раствора натрия карбоната и

доводили до 10,0 мл водой очищенной. Оптическую плотность измеряли через 30 мин при длине волны 760 нм. В качестве компенсационного раствора использовали раствор, состоящий из 0,100 мл экстрагента, 0,150 мл реактива Фолина–Чокальтеу, 4,75 мл 10% раствора натрия карбоната и доведенный до 10,0 мл водой очищенной. Содержание фенольных соединений определяли в пересчёте на галловую кислоту методом градуировочного графика.

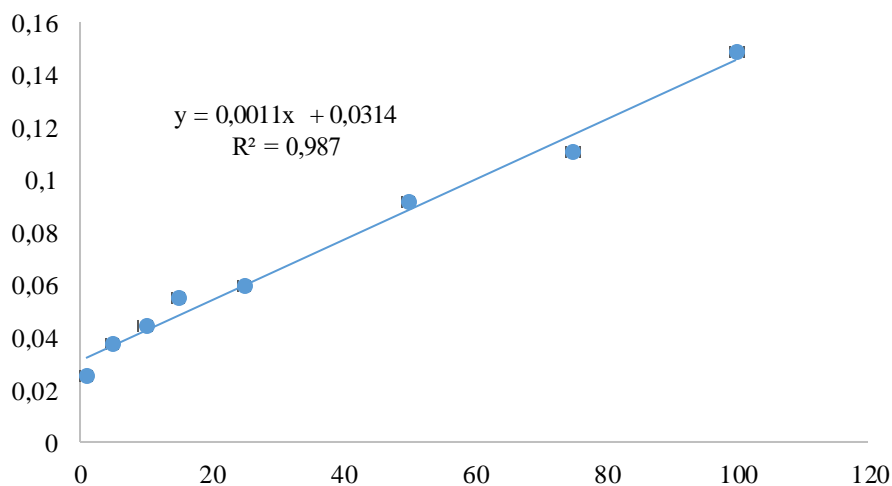
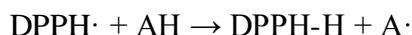


Рис. 1 – Градуировочный график по галловой кислоте

Антиоксидантную активность изучали широко используемым и простым в воспроизведении спектрофотометрическим методом с реактивом DPPH. Метод основан на реакции DPPH, растворенного в этаноле или метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме:



Источником получения свободных радикалов служил этанольный раствор реактива DPPH. После добавления к раствору DPPH извлечения происходит связывание АН со свободными радикалами DPPH·. В результате восстановления DPPH· АН снижается интенсивность окраски раствора. Ход реакции контролировали по изменению оптической плотности при 517 нм [2].

Антиоксидантную активность извлечений (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(A_0 - A_1) \times 100}{A_0},$$

где:

A_0 – оптическая плотность раствора DPPH;

A_1 – оптическая плотность раствора DPPH после добавления извлечения.

Все исследования выполняли по три раза ($P = 95\%$). Результаты представляли в виде среднего значения. Результаты сравнивали между собой, используя t-критерий Стьюдента (при $p < 0,05$ разницу в значениях считали статистически значимой). Для сопоставления результатов, полученных для разных штаммов, выращенных в разных условиях, использовали однофакторный дисперсионный анализ ($p < 0,05$). Для оценки роли ФС в проявляемой антиоксидантной активности извлечений использовали корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции (r).

Результаты и обсуждение

Только в извлечениях, полученных при экстрагировании 96% этиловым спиртом из плодовых тел двух штаммов аурикулярии густоволосистой, выращенной в естественных условиях, обнаружен лютеолин-7-глюкозид.

У всех водно-спиртовых извлечений двух штаммов аурикулярии обнаружены вещества с максимальным поглощением в области 550-555 нм, предположительно, производные нафтацена, хиноны или иные соединения, окрашенные в красный или розовый цвет.

При анализе водных извлечений веществ, совпадающих по спектральным и хроматографическим характеристикам, с имеющимися стандартными образцами, не обнаружили.

Содержание ФС в извлечениях 174 штамма аурикулярии, выращенной в естественных условиях, составило от 3,67 мг% до 6,41 мг%, а у 175 штамма от 3,69 мг% до 4,88 мг%; выращенной на древесных опилках осины: для штамма 174 составило от 9,75 мг% до 14,09 мг%; для штамма 175 – от 8,70 мг% до 14,55 мг%; на древесных опилках ольхи: для штамма 174 составило от 3,70 мг% до 32,13 мг%; для штамма 175 – от 2,91 мг% до 30,98 мг%.

Наибольшее содержание ФС выявлено у извлечений, полученных при экстрагировании 70% этиловым спиртом измельчённых плодовых тел аурикулярии, выращенной на древесных опилках ольхи обоих штаммов (для 174 – в среднем 32,13 мг%; 175 – 30,98 мг%). Наименьшее значение отмечено у извлечений из аурикулярии, выращенной на тех же древесных опилках ольхи обоих штаммов при экстракции 96% этанолом (для 174 – в среднем 3,7 мг%; 175 – 2,91 мг%).

Фактически 174 и 175 штаммы аурикулярии, выращенной в естественных условиях, незначительно ($P=0,28>0,05$) отличаются друг от друга по количественному содержанию ФС; также незначительно отличаются штаммы аурикулярии, выращенной на искусственных субстратах: ($P=0,82>0,05$) – на древесных опилках осины и ($P=0,91>0,05$) – на древесных опилках ольхи.

Содержание ФС в плодовых телах аурикулярии

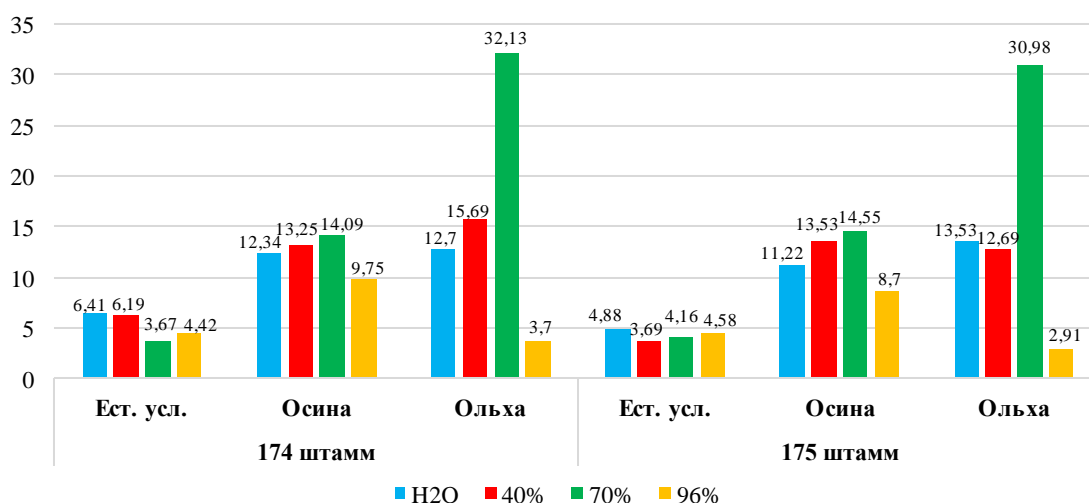


Рис. 2 – Содержание ФС в извлечениях плодовых тел аурикулярии густоволосистой

Антиоксидантная активность извлечений, полученных из аурикулярии, выращенной в естественных условиях, для штамма 174 составила от 4,51% до 19,77%; для штамма 175 – от 7,28% до 16,14%; выращенной на древесных опилках осины: для штамма 174 составила от 17,09% до 49,57%; для штамма 175 – от 15,63% до 46,44%; выращенной на древесных опилках ольхи: для штамма 174 составила от 11,62% до 37,63%; для штамма 175 – от 11,51% до 39,23%.

Наибольшей АОА обладают извлечения, полученные при экстрагировании 70% этиловым спиртом плодовых тел обоих штаммов исследуемого гриба, выращенного на древесных опилках осины (174 – в среднем 49,6%; 175 – 46,4%). Наименьшие значения отмечены у экстрактов из аурикулярии, выращенной в естественных условиях: для 174 штамма при экстракции водой (4,5%), для 175 штамма – при экстракции 96% этанолом (7,3%).

АОА извлечений из 174 штамма аурикулярии, выращенной в естественных условиях и на древесных опилках осины, незначительно выше, чем АОА извлечений из 175 штамма гриба (по количественному показателю), в то время как у исследуемого гриба, выращенного

на древесных опилках ольхи – наоборот: АОА извлечений из 175 штамма гриба выше, чем у извлечений из 174 штамма (по количественному показателю).

Экстрагент	Штамм	Субстрат	А0	% ингибирования свободных рад-лов
Н2О	174	Ест. усл.	1,1693	4,5
		Осина	0,8365	37,3
		Ольха	1,4846	27,6
	175	Ест. усл.	1,1693	11,5
		Осина	0,8365	32,1
		Ольха	1,4846	29,0
40% спирт	174	Ест. усл.	1,2484	15,3
		Осина	0,9522	40,0
		Ольха	1,4755	28,4
	175	Ест. усл.	1,2484	14,7
		Осина	0,9522	38,8
		Ольха	1,4755	37,5
70% спирт	174	Ест. усл.	1,2685	19,8
		Осина	0,9658	49,6
		Ольха	1,4787	37,6
	175	Ест. усл.	1,2685	16,1
		Осина	0,9658	46,4
		Ольха	1,4787	39,2
96% спирт	174	Ест. усл.	1,2273	8,1
		Осина	0,9281	17,1
		Ольха	1,4998	11,6
	175	Ест. усл.	1,2273	7,3
		Осина	0,9281	15,6
		Ольха	1,4998	11,5

Рис. 3 – Антиоксидантная активность извлечений аурикулярии густоволосистой

При этом зависимости АОА от объемной доли этанола для двух штаммов аурикулярии, выращенной в естественных условиях ($P=0,91>0,05$) и на древесных опилках осины ($P=0,78>0,05$) и ольхи ($P=0,73>0,05$) незначительно различались как в количественном, так и в качественном выражении. Для 174 штамма аурикулярии, выращенной в естественных условиях, зависимость носила следующий характер: от воды до 70% этанола происходило резкое поэтапное увеличение активности с резким снижением к 96% этанолу; выращенной на искусственных субстратах: от воды к 70% этанолу плавное увеличение активности с резким снижением к 96% этанолу. Для 175 штамма во всех случаях наблюдали более плавное увеличение к 70% этанолу с резким снижением к 96% этанолу.

Заключение

1. Во всех водно-спиртовых извлечениях были обнаружены вещества с максимумом в спектре от 550 до 555 нм; в сравнении со стандартом идентифицирован лютеолина 7-глюкозид в извлечениях, полученных при экстрагировании 96% спиртом из аурикулярии, выращенной в естественных условиях.

2. Содержание ФС в плодовых телах аурикулярии зависит от субстрата, на котором вырос гриб. При экстрагировании базидиокарпов аурикулярии густоволосистой, выращенной в естественных условиях, выяснилось, что лучше всего ФС извлекались водой и 40% этанолом для 174 штамма; водой и 96% этанолом – для 175 штамма; выращенной на древесных опилках осины и ольхи – 70% спиртом для обоих штаммов.

3. АОА извлечений из аурикулярии, выращенной в естественных условиях, лишь частично обусловлена ФС (для штамма 174 $R = -0,53$; для 175 $R = -0,64$). При этом данная зависимость носит обратный характер. У извлечений из аурикулярии, выращенной на искусственных субстратах, АОА в обоих штаммах обусловлена преимущественно ФС (для осины: у обоих штаммов $R = 0,99$; для ольхи: для штамма 174 $R = 0,93$, для 175 $R = 0,8$). Таким образом, субстрат, на котором вырос гриб и сформированы его плодовые тела, обуславливает содержание ФС и АОА извлечений, получаемых в ходе экстрагирования.

Список литературы

1. Бордок, И. В. Интродукция ценного лекарственного гриба *Auricularia polytricha* (mont.) Sacc. в интенсивную культуру / И. В. Бордок, Л. В. Евтушенко, В. М. Лубянова. // Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века: материалы 17-й международной научной конференции / под ред. С. А. Маскевича, С. С. Позняка. – Минск: ИВЦ Минфина, 2017. – Ч. 2. – С. 19-20.

2. Новаш, Д. С. Антиоксидантная активность водно-органических извлечений из травы эхинацеи пурпурной (*Echinaceae purpureae herba*) / Д. С. Новаш // Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2021: сборник материалов 75-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых; под редакцией С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка. – Минск: БГМУ, 2021. – С. 1136-1140.

3. *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells / Jie Yua, Ruilin Sunb, Zhongquan Zhaoc, Yingyu Wang // International Journal of Biological Macromolecules. – 2014. – No. 68. – P. 67-71. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.018

4. Ergosterol of *Cordyceps militaris* Attenuates LPS Induced Inflammation in BV2 Microglia Cells / Chanin Sillapachaiyaporn, Siriporn Chuchawankul, Sunita Nilkhet, Nuntanat Mounkote, Tewarit Sarachana, Alison T Ung, Seung Joon Baek, Tewin Tencomnao // Food research international. – 2022. – No. 187. – P. 23-29. DOI:10.1177/1934578X1501000623

5. Neuroprotective effects of ergosterol against TNF- α -induced HT-22 hippocampal cell injury / Chanin Sillapachaiyaporn, Kuljira Mongkolpobsin, Siriporn Chuchawankul, Tewin Tencomnao, Seung Joon Baek // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2022. – Vol. 154, No. 3. – P. 89-93. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113596

6. Song, G. Isolation of a polysaccharide with anticancer activity from *Auricularia polytricha* using high-speed countercurrent chromatography with an aqueous two-phase system / Guanglei Song, Qizhen Du // Journal of Chromatography A. – 2020. – No. 1217. – P. 5930-5934. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.07.036