

Prace
eksperymentalne



Polisacharydy z hodowli mycelialnej *Aleuria aurantia* (Fr.) Fuck.

Janina Węgiel
Sławomir Jurczyk
Stanisław Kohlmünzer
Katedra i Zakład Botaniki
Farmaceutycznej
Collegium Medicum Uniwersytet
Jagielloński
Kraków

1. Wstęp

Polisacharydy (wielocukrowce) są związkami powszechnie występującymi w świecie roślinnym. Polisacharydy grzybów wielkoowocnikowych (*Macromycetes*) są od kilkunastu lat przedmiotem szczególnego zainteresowania kilku ośrodków badawczych, głównie japońskich, ze względu na ich właściwości przeciwtumoralne i immunotropowe. Świadczą o tym liczne prace autorów japońskich (1-4) oraz wprowadzenie do oficjalnego leczenia preparatów wykazujących właściwości przeciwnowotworowe, mianowicie Lentinanu, Crestinu i Schizophylanu.

Biologicznie aktywne polisacharydy mają zazwyczaj strukturę β -glukanów z wiązaniami β (1-3) i rozgałęzieniami β (1-6) albo β (1-4) też z rozgałęzienia-

mi β (1-6). Niekiedy polisacharydy te, np. Crestin, zawierają fragment peptydowy (do 15%), który wpływa na możliwość zastosowania danego polisacharydu drogą doustną jako środka przeciwnowotworowego lub immunomodulującego. W Katedrze Botaniki Farmaceutycznej został izolowany z owocników *Tylophilus felleus* nowy polisacharyd grzybowy o strukturze β -glukanu Tylophilan z wiązaniami β (1-3) i rozgałęzieniami β (1-6) o masie cząsteczkowej 1 300 000, który wykazywał wybitne działanie przeciwnowotworowe w testach Sarcoma 180 (ponad 90% inhibicji), a także interesujące właściwości immunomodulacyjne jako immunomodulator komórkowej odporności nieswoistej oraz swoistej odporności humoralnej (5,6).

Z innych gatunków grzybów wielkoowocnikowych (klasy *Basidiomycetes*) oraz ich hodowli mycelialnych otrzymano podobne polisacharydy, które są aktualnie przedmiotem dalszych badań.

Grzyby klasy *Ascomycetes* dotychczas nie były przedmiotem badań w tym kierunku. W związku z tym podjęto próbę uzyskania polisacharydów z hodowli mycelialnej gatunku *Aleuria aurantia*. Hodowlę tę podjęto ze względu na trudności uzyskania odpowiedniej ilości materiału (owocników) ze stanu naturalnego.

2. Hodowla mycelialna

Hodowle mycelialne niektórych gatunków grzybów klasy *Basidiomycetes* prowadzone są w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej CM UJ w Krakowie od szeregu lat z dobrymi rezultatami, zwłaszcza jeżeli chodzi o grzyby nadrzewne i niektóre gatunki grzybów mikoryzowych. Hodowla mycelialna wymaga pracy w warunkach aseptycznych, zastosowania odpowiednich pożywek hodowlanych gwarantujących uzyskanie dobrego wzrostu grzybni w warunkach laboratoryjnych. Prowadzenie hodowli mycelialnych ma na celu różne aspekty, przede wszystkim uzyskanie odpowiedniej ilości surowca do biochemicznych i biologicznych badań grzybów, uniezależniając się od warunków klimatycznych, glebowych, pory roku itp., możliwość uzyskania substancji pokarmowych: białek, lipidów, witamin (hodowla na skalę przemysłową takich gatunków jak: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* i in.). Z punktu widzenia farmakologicznego hodowle mycelialne mogą służyć do otrzymywania substancji biologicznie aktywnych, przede wszystkim: antybiotyków (penicylina z hodowli gat. *Penicillium*), alkaloidów (*Claviceps purpurea*), a także ostatnio polisacharydów — substancji wykazujących działanie immunotropowe, które znalazły zastosowanie w leczeniu niektórych schorzeń nowotworowych (7,8).

Hodowle mycelialne, jako metoda biotechnologiczna, stwarzają duże możliwości otrzymania substancji o zmienionych właściwościach chemicznych i biologicznych w porównaniu z owocnikami — poprzez zmianę warunków wegetacji, dobór odpowiedniej pożywki, zastosowanie prekursorów. Prowadzenie hodowli może odbywać się na podłożach naturalnych (słoma, kłody drewniane, torf) i na podłożach syntetycznych. Hodowle stałe prowadzone

mogą być na szalkach Petriego (pożywka zestalona agarem), hodowle płynne przez wytrząsanie w kolbach stożkowych lub w biofermentorach.

Pożywka hodowlana powinna zawierać odpowiednie źródła węgla, np. glukoza, ekstrakt maltozowy; źródła azotu: aminokwasy (m.in. arginina, asparagina, walina), hydrolizat kazeiny, sole amonowe; makroelementy: P, Ca, Mg, K, Na; mikroelementy: Cu, Fe, Mn, Zn, Li, Cs; witaminy: tiamina, biotyna, inozytol, pirydoksyna. pH pożywki powinno wynosić 5-6, a dla gatunków nadrzewnych około 4. Temperatura wzrostu 25-28°C; przy hodowlach wytrząsanych ważna jest ilość powietrza: 0,08-0,15 dm³/min/litr pożywki.

Metody uzyskania czystej kultury mycelialnej mogą być następujące:

- 1) z pojedynczego zarodnika (spory) lub zawiesiny spor,
- 2) z wycinka tkanki z trzonu lub warstwy hymenialnej,
- 3) z grzybni vegetatywnej.

W rozwoju grzybni obserwujemy 3 fazy wzrostu grzybni:

- 1) faza przygotowawcza (4-6 dni),
- 2) faza wzrostu logarytmicznego (około 15 dni),
- 3) faza stacjonarna (powyżej 15 dni).

Hodowle mogą być prowadzone w ciemności, w świetle, przy przemiennym oświetleniu dzień-noc, a także przy sztucznym oświetleniu, co może wpływać na intensywność wzrostu.

Na podstawie danych z piśmiennictwa i własnych (9-11) można stwierdzić, że hodowle mycelialne mogą być źródłem bioaktywnych substancji, jak np. polisacharydów, związków indolowych, steroidów, antybiotyków i innych.

Aleuria aurantia jest gatunkiem interesującym ze względu na obecność substancji wykazujących znaczną aktywność biologiczną.

Celem pracy było otrzymanie frakcji polisacharydowych z hodowli mycelialnej *Aleuria aurantia* oraz wstępna analiza otrzymanych frakcji i określenie składu cukrowego. Wśród dotychczas wykrytych metabolitów wyciągu eteru naftowego i metanolowego grzybni stwierdzono obecność: związków steroidowych, kwasów tłuszczowych, amin IV-rzędowych oraz związków indolowych (12). Natomiast w wyciągu wodnym podjęto próbę izolacji frakcji polisacharydowych.

3. *Aleuria aurantia* — występowanie, morfologia, skład chemiczny

Aleuria aurantia — dziezka pomarańczowa (rodz. *Aleuriaceae*, klasa *Ascomycetes*) tworzy owocniki w kształcie miseczki o średnicy 2-10 cm, pomarańczowe bez trzonu. Miąższ cienki, woskowaty, kruchy, bez smaku. Zarodniki są bezbarwne, podłużnie eliptyczne, z siatkowatą ornamentacją o wymiarach 16-24 x 8-12 μm.

Występowanie: na nagiej ziemi, w miejscach nasłonecznionych przy drogach, na brzegach lasów i zarośli, parkach. Owocniki są jadalne, można je spotkać od wiosny do jesieni. W Polsce gatunek średnio pospolity (13).

4. Część doświadczalna

4.1. Hodowla mycelialna gat. *Aleuria aurantia*

Hodowlę mycelium *Aleuria aurantia* prowadzono na zmodyfikowanej pożywce wg Oddoux o następującym składzie: glukoza 10 g, ekstrakt maltozowy 5-10 g, NH_4Cl 0,5 g, L-asparagina 1,0 g, KH_2PO_4 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, FeCl_3 (1%) 10 kropli, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5%) 1,5 cm^3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5%) 1,5 cm^3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2%) 5 cm^3 , hydrolizat kazeiny 200 mg, ekstrakt drożdżowy 30 mg, adenina 12 mg, woda destylowana ad 1000 cm^3 . Do sporządzenia pożywki stałej dodawano 1,5-2% agaru. Inoculum do przeszczepu stanowiły fragmenty owocników o wymiarach 2-3 mm, z części hymenialnej, zebranych ze stanu naturalnego (wrzesień 1998, Poręba – Koninki), które dezynfekowano 70% etanolem. Hodowlę prowadzono na pożywce stałej oraz płynnej. Pożywkę sterylizowano w autoklawie w temp. 120°C, przy nadciśnieniu 1 atm. w ciągu 20 min.

4.1.1. Hodowla stała

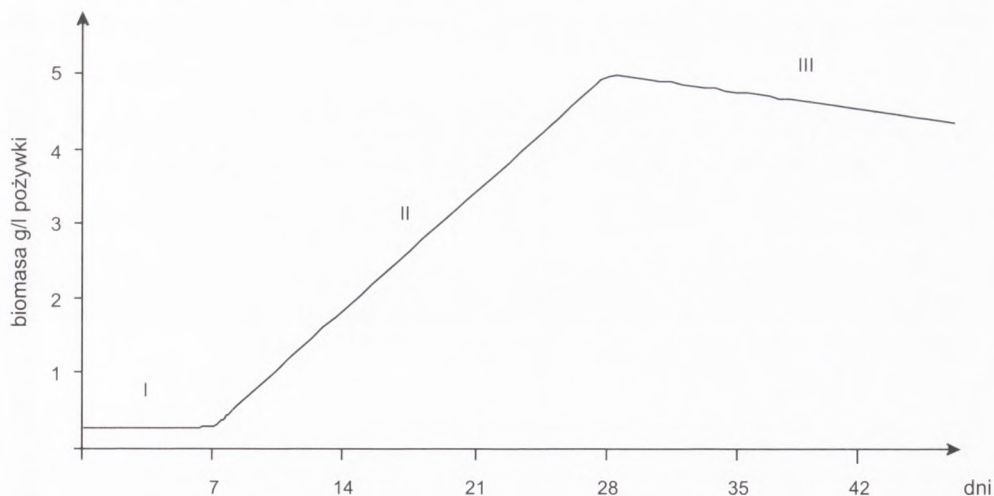
Wysterylizowaną pożywkę rozlewano w warunkach aseptycznych na szalki Petriego średnicy 5 cm. Hodowlę prowadzono w termostacie 25±1°C przez 20 dni w ciemności. W celu otrzymania odpowiedniej ilości materiału zastosowano kilkakrotne pasażowanie.

4.1.2. Hodowla płynna

Hodowlę płynną prowadzono w kolbach Erlenmayera i w fermentorze. Po wysterylizowaniu pożywki (jw.) rozlewano ją do 500 cm^3 kolb Erlenmayera w ilości ok. 200 cm^3 i szczepiono inoculum pochodzącym z pożywki stałej. Hodowlę wytrząsano na wytrząsarce (100 suwów/min) przez 3 tygodnie w temperaturze ok. 20°C przy przemiennym oświetleniu dzień/noc. Mycelium otrzymane z hodowli płynnej służyło do przeszczepu w fermentorze o pojemności 6 l typ HWS firmy Kuhn-Bayer Nidderau (Niemcy) z automatycznym regulowaniem przepływu sterylnego powietrza pH i temp. przez 3 tygodnie. Wzrost grzybni przebiegał w 3 zróżnicowanych fazach (rys. 1). Po upływie 3 tygodni otrzymano 30 g grzybni liofilizowanej.

4.2. Ekstrakcja grzybni

Zliofilizowaną grzybnię ekstrahowano rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności kolejno: eterem naftowym, metanolem i wodą. Uzyskano wyciąg eteru naftowego L — zawierający lipofilne metabolity, wyciąg metanolowy H — metabolity hydrofilne, wyciąg wodny W — metabolity rozpuszczalne w wodzie. Analiza metabolitów wyciągu L i H była przedmiotem innego doniesienia (14).

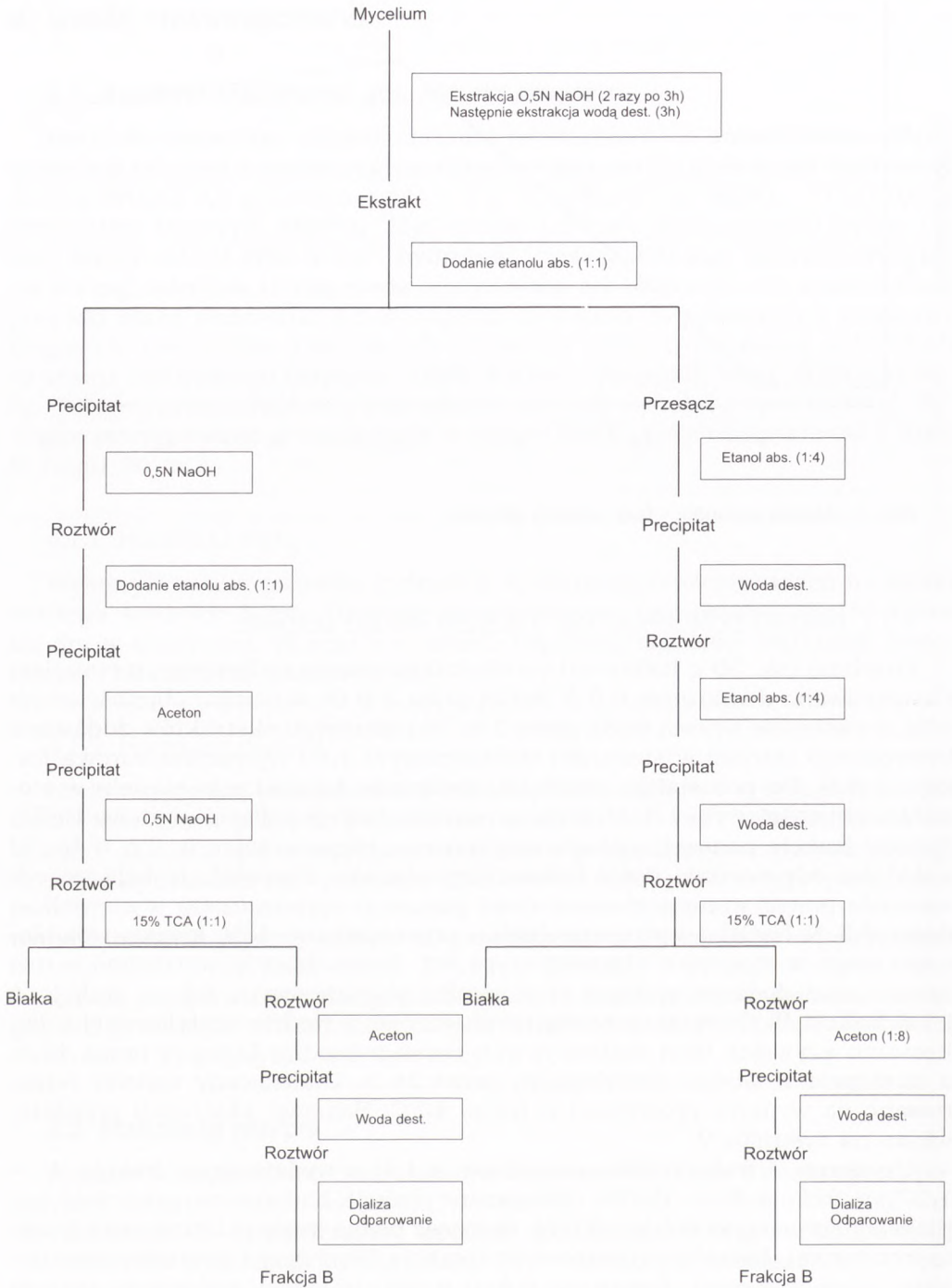


Rys. 1. *Aleuria aurantia* – fazy wzrostu grzybnia.

4.2.1. Izolacja polisacharydów z grzybnia *Aleuria aurantia*

Grzybnię (ok. 30 g liofilizatu) po ekstrakcji eterem naftowym i metanolem ekstrahowano dwukrotnie 0,5 N NaOH przez 3 h (w stosunku objętościowym 1:5), a następnie wrzącą wodą przez 3 h. Po połączeniu ekstraktów dodawano bezwodnego etanolu w stosunku objętościowym 1:1 i wytrącono surową frakcję A (FA). Do pozostałego przesączu dodawano bezwodnego etanolu w stosunku objętościowym 1:4, otrzymując surową frakcję polisacharydową B (FB). Surowe frakcje polisacharydowe oczyszczono, rozpuszczając w 0,5 N NaOH i dodając odpowiednie ilości bezwodnego etanolu. Pozostałe frakcje po odsączeniu przemywano acetonem. Osad ponownie rozpuszczano w niewielkiej ilości 0,5 N NaOH i wytrącano białko przez dodanie 15% kwasu trójchlooroctowego w stosunku objętościowym 1:1. Polisacharydy wytrącono z roztworu przez dodanie acetonu w stosunku objętościowym 1:2 — frakcja A i 1:8 frakcja B. Otrzymane osady rozpuszczono w wodzie destylowanej i dializowano używając błon dializacyjnych Serva w wodzie bieżącej przez 48 h, a następnie w wodzie destylowanej przez 24 h. Dializowany roztwór odparowano na wyparce próżniowej w temp. 40°C. Schemat ekstrakcji przedstawiono na rysunku 2.

Uzyskano 2 frakcje polisacharydowe A i B z wydajnością: frakcja A — 1,97% i frakcja B — 0,27%. Otrzymane frakcje badano na zawartość popiołu wg *Farmakopei Polskiej IV*(15), obecność białka (reakcja biuretowa i ksantoproteinowa), kwasów nukleinowych (reakcja Dischego) i aminokwasów (reakcja ninhydrynowa). Zawartość cukru w obu frakcjach oznaczono metodą kolorymetryczną wg Dubois'a (16). Obydwie frakcje poddano hydrolizie kwasowej 1 M H₂SO₄ w temp. 120°C przez okres 5 h. Hydrolizat zobojętniono



Rys. 2. Schemat izolacji polisacharydów.

Ba/OH₂, wytrącony osad BaSO₄ — odsączono, przesącz odparowano do sucha. Suche pozostałości rozpuszczano w 70% etanolu i analizowano metodą chromatografii bibułowej (PC) na zawartość cukrów prostych i aminokwasów.

Stosowano następujące układy rozpuszczalników:

- n-propanol-octan etylu-woda 7:1:2 v/v/v,
- n-butanol-kwas octowy lodowaty-woda 4:1:5 v/v/v.

Plamy cukrów uwidoczniono roztworem szczawianu aniliny (po podgrzaniu do 105°C), a plamy aminokwasów 1% roztworem ninhydryny (również po podgrzaniu).

5. Omówienie wyników

Hodowla gatunku *Aleuria aurantia* (Fr.) Fuck. została po raz pierwszy opracowana na pożywcę stałej i płynnej wg Oddoux z własnymi modyfikacjami. Uzyskano dobrą wydajność suchej biomasy mycelialnej wynoszącą 2,5-5 g/litr pożywki. Wzrost grzybni przebiegał w 3 fazach: 1) przygotowawcza (do 5 dni), 2) wzrostu logarytmicznego (10-15 dni), 3) stacjonarna (powyżej 15 dni) (rys. 1). W otrzymanym mycelium stwierdzono poza metabolitami występującymi w wyciągu L i H (sterydy, kwasy tłuszczowe, związki indolowe), w wyciągu wodnym dwie frakcje polisacharydowe z dobrą wydajnością (zwłaszcza frakcja A — 1,97%). Obie frakcje wykazywały wysoką zawartość cukru oznaczoną metodą Dubois'a: frakcja A — 88%, frakcja B — 69%. Zawartość popiołu była nieznaczna we frakcji A — 2,87%. W obu frakcjach nie stwierdzono obecności białka, wolnych aminokwasów i kwasów nukleinowych.

Analiza obu frakcji po kwasowej hydrolizie wykazywała obecność: glukozy, galaktozy, mannozy oraz fragmentu peptydowego złożonego z leucyny, kwasu glutaminowego i glicyny. Tego typu heteroglukany — jak wspomniano — z częścią peptydową wykazują często aktywność przeciwnowotworową, także przy podaniu doustnym. Otrzymane polisacharydy zostały przekazane do badania aktywności przeciwapalnej i wazoprotekcyjnej.

Literatura

1. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y., Arai Y., Fukuoka F., (1970), *Cancer Res.*, 30, 2776-2781.
2. Maeda Y., Chihara G., (1971), *Nature*, 229, 634.
3. Fuji T., Maeda Y., Suzuki F., Ishida N., (1978), *J. Antibiot.*, 11, 1079.
4. Miazaki Y., Oikawa N., Yamada H., Yadomae T., (1978), *Carbohydr. Res.*, 65, 235.
5. Defaye J., Kohlmünzer S., Sodzawiczny K., (1988), *Carbohydr. Res.*, 173, 316-323.
6. Kohlmünzer S., Grzybek J., Tanaka M., (1980), *Planta Medica*, 39, 231-232.
7. Kohlmünzer S., (1988), *Wszechświat*, 89, 10-13.
8. Hensel A., Kraus J., Franz G., (1988), *Deutsche Apotheker Zeitung*, 25, 128, 1305-1309.

9. Kohlmünzer S., (1992), *Problemy Higieny*, 36, 10-15.
10. Kohlmünzer S., Węgiel J., Rudek R., (1992), *Acta Pol. Pharm.*, 43, 27-29.
11. Kohlmünzer S., Grzybek J., Węgiel J., (1992), *Acta Pol. Pharm.*, 49, 31-34.
12. Węgiel J., Kohlmünzer S., (1998), *Sixth International Mycological Congress*, Jerusalem, Israel, 1998, Abstr., 159.
13. Gumińska B., Wojewoda W., (1988), *Grzyby i ich oznaczanie*, PWRiL, Warszawa.
14. Węgiel J., Kohlmünzer S., (1999), *Pharm. Biology*, (w druku).
15. *Farmakopea Polska*, IV, (1965), vol. I, PZWL, Warszawa.
16. Dubois M., Gilles K., Hamilton J.K., Robers P.A., Smith F., (1956), *Anal. Chem.*, 28, 350.

Polysaccharides from the mycelial culture of *Aleuria aurantia* (Fr.) Fuck.

Summary

The mycelial culture of the fungus *Aleuria aurantia* (Fr.) Fuck., *Ascomycetes* was established both on solid as well as on liquid nutrient media acc. Oddoux with some modifications. The culture was run for 3 weeks. Three distinct developing phases of growth were observed. The yield of dried mycelial biomass was 2,5-5,0 g/l respectively.

30 g of liophilized mycelium was used as a starting material for metabolites isolation. Two polysaccharide fractions A and B have been isolated from the water extract of the mycelium by subsequent praecipitation with ethanol and further purification. Fraction A isolated with good yield (1,97%) proved to be a heteroglucan composed of glucose, galactose and mannose. It also contained a peptidic part with leucine, glycine and glutamic acid as components. It was submitted to evaluation of its biological activity. This kind of polysaccharides has often a marked immunotropic activity.

Key words:

Aleuria aurantia, mycelial culture, heteroglucan.

Adres do korespondencji:

Janina Węgiel, Katedra Botaniki Farmaceutycznej Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków.