

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМЕНІ М. Г. ХОЛОДНОГО

Аль-Маалі Галєб Аднанович

УДК 582.284.5 : 579.222

**ВПЛИВ ЦИТРАТІВ МЕТАЛІВ, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ
АКВАНАНОТЕХНОЛОГІЇ, НА БІОЛОГІЮ *GANODERMA
LUCIDUM* (CURTIS) P. KARST. І *TRAMETES VERSICOLOR* (L.)
LLOYD. У КУЛЬТУРІ**

03.00.21 – мікологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ-2017

Дисертація є рукопис

Робота виконана у відділі мікології Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України

Науковій керівник: доктор біологічних наук,
лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки
БІСЬКО Ніна Анатоліївна,
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України,
провідний науковий співробітник відділу мікології

Офіційні опоненти: Доктор біологічних наук, професор
СУХОМЛИН Марина Миколаївна,
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
Імені Тараса Шевченка
Професор кафедри фізіології та екології рослин

Кандидат біологічних наук,
Старший науковий співробітник
КРУПОДЬОРОВА Тетяна Анатоліївна,
ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки» НАН України,
Старший науковий співробітник
лабораторії екстракції рослинної сировини та біоконверсії

Захист відбудеться 27 квітня 2017 року о 13-00 годині на засіданні спеціалізованої ради Д 26.211.01 при Інституті ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України за адресою: 01601, м. Київ, вул. Терещенківська, 2.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України за адресою: 01025, м. Київ, вул. Велика Житомирська, 28.

Автореферат розісланий _____ 2017 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради, д.б.н.

О. М. Виноградова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Особливе місце серед лікарських базидіоміцетів посідають *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. і *Trametes versicolor* (L.) Lloyd., які мають тривалу історію використання у традиційній східній медицині для лікування та профілактики численних захворювань (Wasser, 2014). Сучасні дані підтверджують значний лікарський потенціал цих видів, що виявляється в антипухлинних, імуностимулювальних, антибактеріальних, антивірусних, гепатопротекторних і протизапальних властивостях (Chen, 2006; Patel et al., 2012), які зумовлені наявністю численних сполук із фармакологічною активністю (Zong et al., 2012; Wasser, 2014). Окрім того, міцелій і культуральну рідину *G. lucidum* та *T. versicolor* використовують для отримання лігноцелюлозолітичних ферментів, таких як лаказа та Манган-залежна пероксидаза (Wang et al., 2006; Levasseur et al., 2008).

Значну роль у фізіології живлення *G. lucidum* і *T. versicolor* відіграють іони есенціальних мікроелементів. Найважливішими для повноцінного функціонування еукаріотичної клітини мікроелементами є Цинк, Ферум, Купрум та Манган (Vanci, 2013). Цинк має фундаментальне значення для всіх сфер життя, оскільки він входить до складу каталітичних і структурних центрів великого масиву білків та є єдиним металом, який трапляється у ферментах усіх класів (Broadley et al., 2007). Майже 25% Цинк-зв'язаних білків пов'язані з транскрипційною регуляцією (Staats et al., 2015). Більшість окисно-відновних реакцій у клітині відбувається за участі ферментів, що містять іони Феруму, Купруму чи Мангану в координаційному центрі (Kaım, 2013; Kaplan, 2013). Ферум-залежні ферменти беруть участь майже у всіх основних процесах, що відбуваються в клітинах: циклі трикарбонових кислот, диханні, трансляції, реплікації та репарації ДНК, метаболізмі ксенобіотиків, транспорті Оксигену, синтезі антибіотиків і інших малих молекул. Вони необхідні для синтезу основних компонентів клітини: ліпідів, білків, нуклеїнових кислот (Philpott et al., 2012). Манган, як кофактор, входить до складу ферментів, які каталізують гідролітичні й окисно-відновні реакції (Law et al., 2008). Серед цих ферментів основну роль відіграють Манган-залежна супероксиддисмутаза, різні каталази та пероксидази (Kaım, 2013). Купрум входить до складу ряду ключових ферментів, необхідних для повноцінного функціонування будь-якої еукаріотичної клітини, насамперед, до цитохром с-оксидази, супероксиддисмутази і чисельних Купрум місних оксидаз (Vanci, 2013).

Відомо, що органічні сполуки металів характеризуються більшою біологічною доступністю, ніж неорганічні аналоги. Перспективними з цього погляду є солі карбонових кислот, серед яких цитрати металів, дозволені до використання в харчовій промисловості (Сердюк та ін, 2009). Проте, традиційні методи отримання карбоксилатів працемісткі й енергозатратні. До того ж, отримані сполуки мають низьку хімічну чистоту. Інтенсивний розвиток нанотехнологій дав змогу створити низку методів, що уможливило промислове виробництво цитратів металів із високим ступенем чистоти (Пат. 39392 України). Ряд дослідників (Наноматеріали..., 2010) відзначають

високу біологічну активність цитратів металів щодо рослинних об'єктів, мікроорганізмів і тварин. Стосовно впливу цитратів металів, отриманих методом аквананотехнологій, на біологію ксилотрофних базидієвих грибів у культурі існують лише фрагментарні дані (Клечак та ін., 2013; Бандура, 2014).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відділі мікології Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України протягом 2013 – 2016 рр., відповідно до планів науково-дослідних робіт за темами «Біологічні властивості штамів колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки (ІВК)» (№ д/р 0115U002001), «Біологічні властивості сапротрофних макроміцетів у культурі» (№ д/р 0110U001264) та згідно цільової комплексної програми науково-дослідних робіт НАН України „Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства” за темою «Скринінг лікарських грибів-продуцентів цитокінінів для створення новітніх біологічно-активних препаратів та лікувальних засобів» і за договором з ТОВ „Антиген” (Республіка Казахстан) щодо проведення науково-дослідних робіт за темою «Розробка біотехнології отримання біологічно активних добавок на основі базидієвих грибів з широким спектром лікарсько-профілактичної дії».

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є вивчення впливу цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, на біологію лікарських грибів *Ganoderma lucidum* і *Trametes versicolor* у культурі. Для досягнення мети були поставлені такі **завдання**:

1. Підібрати оптимальні концентрації цитратів Цинку, Феруму, Купруму та Мангану для накопичення біомаси міцелію *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353 на рідких живильних середовищах.
2. Порівняти ступінь акумуляції зазначених металів міцелієм *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353 в умовах глибинної культури на живильному середовищі з цитратом або сульфатом відповідного мікроелементу.
3. Оцінити вплив оптимальних концентрацій цитратів цих металів на синтез міцелієм *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353 екстрацелюлярних сполук: екзополісахаридів та біотехнологічно важливих ферментів – лакази та Манган-залежної пероксидази.
4. Оцінити кількісні зміни, пов'язані з накопиченням сирого протеїну, загальних ліпідів, загальних вуглеводів та зольних елементів міцелієм *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353 в умовах глибинної культури на живильному середовищі з цитратом або сульфатом відповідного мікроелементу.
5. Дослідити вплив цитратів зазначених металів на синтез ендополісахаридів міцелієм *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353 в умовах глибинної культури.
6. Порівняти вплив цитратів та сульфатів, використаних у дослідженні металів, на амінокислотний, жирнокислотний та моносахаридний склад

біомаси *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353, отриманої в умовах глибинної культури.

7. Вивчити вплив цитратів цих металів на синтез цитокінінів міцелієм *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353 в умовах глибинної культури.

8. Дослідити вплив цитратів зазначених металів на вміст ганодерових кислот у біомасі *G. lucidum* 1900 в умовах глибинної культури.

Об'єкт дослідження. Процес культивування чистих культур штамів цінних лікарських ксилотрофних базидіоміцетів *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353 на рідких живильних середовищах з різними цитратами металів, отриманих методом аквананотехнології.

Предмет дослідження. Зміни в біології чистих культур *G. lucidum* 1900 і *T. versicolor* 353, індуковані цитратами Цинку, Феруму, Купруму та Мангану, синтезованими методом аквананотехнології.

Методи дослідження. У процесі вирішення завдань використано загальноприйняті мікологічні, мікробіологічні, фізіолого-біохімічні та математично-статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено комплексне дослідження впливу різних цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, на біологію цінних лікарських грибів *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 в культурі. Проведено порівняльне дослідження впливу цитратів та сульфатів металів на параметри росту міцелію, синтез екзополісахаридів, активність ферментів культуральної рідини (лаказа та Манган-залежна пероксидаза), акумуляцію мікроелементів, біохімічний склад біомаси, а саме вміст сирого протеїну, загальних ліпідів та вуглеводів, зокрема фракції водорозчинних ендполісахаридів, зольних елементів, цитокінінів та ганодерових кислот.

У роботі представлені нові дані, отримані шляхом експериментальних досліджень, і зроблені на їх основі теоретичні положення щодо вірогідних біохімічних та фізіологічних механізмів, що пояснюють різну дію цитратів металів, синтезованих методом аквананотехнології.

Вперше показано, що біологічна дія цитратів Купруму, Цинку та Мангану (синтезованих методом аквананотехнології) на моносахаридний, амінокислотний та жирнокислотний склад міцелію лікарських грибів *T. versicolor* та *G. lucidum* суттєво відрізняється від дії сульфатів відповідних металів на зазначені показники. На основі отриманих даних були визначені основні біосинтетичні ланки в метаболічних шляхах синтезу цих сполук та окреслено коло ферментів, які відповідають за серію виявлених змін (індукованих цитратами металів) в моносахаридному, амінокислотному та жирнокислотному складі біомаси досліджених штамів.

Додатковим результатом експериментальної роботи стало встановлення наявності раніше не виявлених у міцелію *T. versicolor* та *G. lucidum* фітогормонів, що відносяться до групи цитокінінів, які демонструють широкий спектр протипухлинних властивостей. Отримані дані дали змогу вперше пов'язати широко відомі протипухлинні властивості зазначених грибів із наявністю в їхній біомасі цитокінінів.

Практичне значення отриманих результатів. Важливим науковим результатом стало експериментальне обґрунтування доцільності використання цитратів Цинку, Мангану та Купруму, синтезованих методом аквананотехнології, з метою збільшення біосинтетичної активності міцелію лікарських грибів *T. versicolor* та *G. lucidum* в умовах глибинної культури.

Отримані дані дозволили розробити конкретні рекомендації щодо оптимальних концентрацій зазначених цитратів для підвищення продуктивності цих видів за рядом біотехнологічно важливих показників (біомасою, сирим протеїном, загальними ліпідами, загальними вуглеводами, ендо- та екзополісахаридами, ганодеровими кислотами тощо) з метою отримання біологічно активних добавок та функціональних продуктів з високим вмістом фізіологічно активних речовин.

Особистий внесок здобувача. Робота є самостійним дослідженням здобувача, яким проаналізовано наукову літературу, виконано основний обсяг експериментальних досліджень, узагальнено результати, систематизовано та статистично оброблено дані експериментального матеріалу.

Розробка основного плану досліджень, обговорення результатів та формулювання висновків, підготовка наукових статей, було проведено спільно з науковим керівником дисертаційної роботи, д-ром біол. наук Н. А. Бісько. Амінокислотний, жирнокислотний та моносахаридний аналіз досліджено у співпраці з канд. біол. наук А. М. Остапчуком (Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України). Аналіз цитокінінів у біомасі здійснено у співпраці з д-ром біол. наук І. В. Косаківською та д-ром біол. наук Н. П. Веденічевою (Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України). Визначення вмісту загального азоту в біомасі виконано у співпраці з канд. с-х. наук. І. І. Бандурою (Таврійський державний агротехнологічний університет). Кількісний аналіз мікроелементів проведено у співпраці з канд. біол. наук І. Н. Андрусишиною (Інститут медицини праці АМН України). У роботах, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача становить не менше 75%.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати роботи викладено та обговорено на засіданнях відділу мікології Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (м. Київ, 2013 – 2016), на засіданні Вченої ради Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (м. Київ, 2016). Результати дисертаційної роботи були представлені на конгресі з медичної мікології «Успехи медицинской микологии» (м. Москва, 2014, 2015), на VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 200-й річниці з дня народження Т. Г. Шевченка «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, 2014), міжнародних конференціях молодих вчених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (м. Полтава, 2015), «Актуальні питання сучасної науки» (м. Одеса, 2014).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 8 статей, з них 6 – у періодичних фахових виданнях, серед них, одна – у зарубіжному виданні, та 2 статті у наукових періодичних багатофахових зарубіжних

виданнях, а також 5 тез доповідей у наукових збірниках вищезазначених конференцій і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 7 розділів, висновків і списку використаних джерел літератури (333 джерела, з них 267 – іншомовні). Загальний обсяг роботи становить 185 стор., з них 146 стор. займає текстова частина роботи і 39 стор. – список джерел літератури. Дисертація ілюстрована 37 рисунками і 18 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі проаналізовано сучасний стан досліджень ролі мікроелементів у фізіології грибів. Розглянуті питання внутрішньоклітинного транспорту іонів металів та їх роль у біохімії грибів. Наведені літературні дані, що доводять безпечність, технологічність та перспективність використання цитратів металів, синтезованих методом аквананотехнології, для культивування базидієвих грибів. Узагальнено результати праць щодо лікарських та біотехнологічних властивостей *T. versicolor* та *G. lucidum*.

З урахуванням аналізу літературних даних обґрунтовано актуальність дослідження впливу цитратів металів, синтезованих методом аквананотехнології, на біологію *T. versicolor* та *G. lucidum*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для дослідження були відібрані штами *Trametes versicolor* 353 та *Ganoderma lucidum* 1900 з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України. Штами обрано за результатами скринінгу біотехнологічно цінних штамів *T. versicolor* і *G. lucidum* (Круподьорова, 2009; Антоненко, 2013).

В усіх дослідженнях у ролі контролю використовували живильне середовище такого складу, г/дм³: глюкоза – 25; пептон – 3; дріжджовий екстракт – 3; K₂HPO₄ – 1; KH₂PO₄ – 1; MgSO₄•7H₂O – 0,25; дистильована вода – 1дм³; рН 6,5 (ГПД). У дослідних варіантах, до живильного середовища ГПД додавали різні концентрації цитратів Цинку, Мангану, Купруму та Феруму. Всі цитрати металів синтезовані методом аквананотехнології групою під керівництвом д. т. н. В. Г. Каплуненко. У випадку, коли цитрат досліджуваного металу суттєво впливав на приріст біомаси щодо контролю, ставили додатковий дослід з аналогічними концентраціями цього металу у формі сульфату.

Дослідження параметрів росту (абсолютна суха біомаса, параметри використання джерела вуглецю, економічний коефіцієнт) проводили з використанням стандартних методик (Бисько и др., 2012). Загальний азот визначали в абсолютно сухій біомасі (АСМ) методом К'ельдаля, вміст сирого протеїну розраховували з використанням коефіцієнту 6,25 (Cunniff, 1995). Вміст золи визначали за стандартною методикою (Cunniff, 1995). Загальні ліпіди екстрагували з сиріої біомаси модифікованим методом Блайя-Даяра (Manirakiza et al., 2001). Кількість загальних вуглеводів визначали, як

різницю між абсолютно сухою масою міцелію та сумою визначених компонентів (сирий протеїн, загальні ліпіди, зола). Кількість ендополісахаридів та ганодерових кислот у міцелію та вміст екзополісахаридів у культуральній рідині визначали за загально прийнятими методиками (Tsujiura et al., 1992; Бисько и др., 2012). Активність лакази та Манган-залежної пероксидази визначали по раніше описаним методикам (Elisashvili et al., 2009). Кількість мікроелементів, акумульованих міцелієм, визначали методом оптично-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою на приборі Optima 2100 DV (Perkin Elmer, США). Аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили за допомогою газової хроматографії з мас-спектрометрією (GC/MS) на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert. (Agilent technologies, USA). Амінокислотний та моносахаридний склад біомаси визначали методом високоефективної рідинної хроматографії на приборі Agilent 1200 (Agilent technologies, USA). Якісний і кількісний аналіз цитокінінів проводився методом високоефективної рідинної хроматографії на приборі Agilent 1200 LC.

Методи статистичної обробки. Результати статистично оброблені ($P < 0.05$) з використанням дисперсійного аналізу та програм Microsoft Excel 2003 і Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ ВПЛИВ ЦИТРАТІВ РІЗНИХ МЕТАЛІВ НА РІСТ МІЦЕЛІЮ *GANODERMA LUCIDUM* 1900 ТА *TRAMETES VERSICOLOR* 353

Вперше було проведене дослідження впливу різних концентрацій цитратів Цинку, Феруму, Мангану та Купруму на ріст міцелію *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 на рідких живильних середовищах. Для коректної інтерпретації даних, отриманих у дослідах з використанням цитратів зазначених металів, було додатково проведене порівняльне дослідження з використанням сульфатів відповідних металів.

Вперше показано, що цитрати Цинку, Купруму та Мангану проявляють більшу біологічну активність, порівняно з сульфатами зазначених металів, щодо ростової активності міцелію *T. versicolor* 353. Цитрат цинку в дослідах з *G. lucidum* 1900 також проявляв вищу біологічну активність, ніж сульфат цього мікроелементу. Так, за оптимальної концентрації цитрату Купруму ($4 \text{ мг/дм}^3 \text{ Cu}^{2+}$), в живильному середовищі приріст біомаси *T. versicolor* 353 становив 79,9% (порівняно з контрольним середовищем), а на середовищі з сульфатом Купруму (за аналогічної концентрації Cu^{2+}) – лише 49% (порівняно з контрольним середовищем).

Кількість біомаси *T. versicolor* 353 на середовищі з 1 мг/дм^3 іонів Цинку у формі цитрату збільшувалася на 36,7%, стосовно контролю. Встановлено, що заміна у живильному середовищі цитрату Цинку на сульфат Цинку, також стимулювала синтез біомаси *T. versicolor* 353, але не так ефективно: вона зростала на 22%, щодо контролю.

Додавання до живильного середовища цитрату Мангану в оптимальній концентрації за іоном Мангану (1 мг/дм^3) збільшувало синтез

біомаси міцелію *T. versicolor* 353 на 28,9%, порівняно з контролем. Разом з тим, заміна цитрату Мангану на сульфат Мангану в живильному середовищі достовірно не впливала на синтез біомаси *T. versicolor* 353.

На середовищі з оптимальною для росту міцелію концентрацією цитрату Цинку ($1 \text{ мг/дм}^3 \text{ Zn}^{2+}$) біомаса *G. lucidum* 1900 збільшувалася на 28,3%, порівняно з контролем. Водночас, заміна цитрату Цинку на сульфат Цинку в середовищі не призводила до статистично достовірного збільшення біомаси *G. lucidum*, порівняно з контролем.

Ці дані підтверджують вихідну гіпотезу про більшу біологічну активність солей лимонної кислоти, отриманих методом аквананотехнології, порівняно з неорганічними солями.

Виходячи з отриманих даних, для подальшого дослідження були відібрані наступні цитрати металів у концентраціях: 4 мг/л Cu^{2+} , $1 \text{ мг/дм}^3 \text{ Zn}^{2+}$, $1 \text{ мг/дм}^3 \text{ Mn}^{2+}$ для *T. versicolor* 353 та $1 \text{ мг/дм}^3 \text{ Zn}^{2+}$ для *G. lucidum* 1900. Для коректної обробки даних паралельно проводили дослідження впливу сульфатів відповідних металів у аналогічних концентраціях на фізіологічні та біохімічні параметри міцелію *T. versicolor* 353 і *G. lucidum* 1900.

ВПЛИВ ЦИТРАТІВ МЕТАЛІВ НА ПАРАМЕТРИ ВИКОРИСТАННЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА *TRAMETES VERSICOLOR* 353 І *GANODERMA LUCIDUM* 1900 В УМОВАХ ГЛИБИННОЇ КУЛЬТУРИ

Особливості використання джерела Карбону у живильному середовищі та економічний коефіцієнт використання глюкози. Розрахунки показали, що економічний коефіцієнт, який розраховується як співвідношення синтезованої біомаси до кількості спожитої глюкози, зростав більш суттєво на середовищах з цитратами зазначених металів, ніж на середовищах з відповідними сульфатами. Так, у випадку використання оптимальних для синтезу біомаси цитратів металів (цитрат Купруму для *T. versicolor* 353 та цитрат Цинку для *G. lucidum* 1900) було зафіксовано зростання економічного коефіцієнту на 10%, порівняно з контролем. Отримані результати доводять, що збільшення біомаси *G. lucidum* 1900 та *T. versicolor* 353 на середовищах з цитратами досліджуваних металів відбувається за рахунок оптимізації процесу використання органічної речовини (глюкози) на синтез власної біомаси.

Акумуляція мікроелементів міцелієм *Trametes versicolor* 353 і *Ganoderma lucidum* 1900 на живильних середовищах з цитратами металів. Питання акумуляції мікроелементів міцелієм базидієвих грибів входить до кола актуальних питань мікологічної науки. Насамперед, це пов'язано з можливістю використання збагаченого мікроелементами міцелію для лікування та профілактики хвороб, асоційованих з дефіцитом мікроелементів у воді та їжі. Так, біологічно активні добавки, створені на основі збагаченого мікроелементами міцелію різних видів грибів,

використовують для профілактики та лікування захворювань, пов'язаних з дефіцитом мікроелементів (Milovanovic, 2013; Vieira, 2013).

Результати дослідження біомаси *T. versicolor* 353 засвідчили вищу біодоступність іонів Купруму в цитратній формі, ніж у сульфатній. Так концентрація іонів Cu^{2+} у міцелію, культивованом на середовищі з сульфатом Купруму, становила 82,98 мкг/г АСМ, а на середовищі з цитратом Купруму – 162,03 мкг/г АСМ. В той же час, біодоступність іонів Цинку та Мангану не залежала від форми, в якій мікроелемент вносили до живильного середовища. Зазначимо, що враховуючи різний вплив цитратів та сульфатів цих металів на приріст біомаси, можна стверджувати, що на одиницю засвоєних іонів Цинку/Мангану у цитратній формі *T. versicolor* 353 синтезує більше біомаси, ніж на одиницю відповідних іонів, засвоєних у формі сульфату.

Використання джерела Нітрогену на середовищах з цитратами або сульфатами металів. У дослідженнях було показано, що цитрати Цинку, Мангану та Купруму стимулюють споживання Нітрогену з живильного середовища краще ніж сульфати відповідних металів. Так, на контрольному середовищі міцелій *G. lucidum* 1900 використовував на синтез власної біомаси 42,3% Нітрогену від його загальної кількості у середовищі. Цей параметр на середовищі з сульфатом Цинку становив 51,8%, а на середовищі з цитратом Цинку – 65,6%. На контрольному живильному середовищі міцелій *T. versicolor* 353 асимілював 17,7% Нітрогену з живильного середовища; на середовищі з сульфатом Цинку – 22,5%; на середовищі з цитратом Цинку – 26,7%; на середовищі з сульфатом Мангану – 20,3%; на середовищі з цитратом Мангану – 24,3%; на середовищі з сульфатом Купруму – 28,9%; на середовищі з цитратом Купруму – 34,5%.

СИНТЕЗ ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНИХ СПОЛУК МІЦЕЛІЄМ *GANODERMA LUCIDUM* 1900 ТА *TRAMETES VERSICOLOR* 353 НА СЕРЕДОВИЩАХ З ЦИТРАТАМИ РІЗНИХ МЕТАЛІВ

Міцелій грибів, що культивують на рідких середовищах, синтезує численні екстрацелюлярні сполуки (Бисько и др., 2012). Серед яких найбільшу фармакологічну цінність та біотехнологічну перспективність мають екзополісахариди і ферменти.

Іони Мангану в обох формах, цитратній та сульфатній, певною мірою, пригнічували синтез екзополісахаридів *T. versicolor* 353. Так, сульфат Мангану знижував кількість екзополісахаридів в культуральній рідині на 35%, відносно контролю. Хоча в дослідах з цитратом Мангану не було зафіксовано статистично достовірного впливу на загальну кількість екзополісахаридів у культуральній рідині, але він пригнічував синтез екзополісахаридів в розрахунку на одиницю біомаси. На середовищах з цитратом або сульфатом Цинку цей показник був майже на 40% меншим, відносно контролю.

Додавання в живильне середовище для культивування *T. versicolor* 353 іонів Купруму в обох формах (цитратній та сульфатній),

також суттєво знижувало та пригнічувало синтез екзополісахаридів. Так, загальна кількість екзополісахаридів в культуральній рідині зменшувалася на 24% під дією сульфату Купруму і на 66% – під дією цитрату Купруму, порівняно з контролем.

Натомість, цитрат Цинку стимулював синтез екзополісахаридів *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 відповідно на 29% та 12,5%, порівняно з контролем. Сульфат Цинку не впливав на цей параметр.

Вплив цитратів металів на синтез ферментів. Результати, отримані в експериментах з *T. versicolor* 353, свідчать, що сульфат і цитрат Цинку однаково стимулюють синтез лакази, збільшуючи її ферментативну активність, приблизно, в 2,4 рази, порівняно з контролем. Активність лакази на середовищі з сульфатом Мангану була майже втричі вищою за контрольне значення. В той же час, цитрат Мангану стимулював синтез лакази значно інтенсивніше за сульфат. Так, її ферментативна активність на середовищі з цитратом Мангану, була вдвічі вищою, ніж на середовищі з сульфатом Мангану, та в 5,9 разів вищою, порівняно з контрольним середовищем. Водночас, сульфат Купруму стимулював синтез лакази не менш інтенсивно, ніж цитрат Мангану. Подібний ефект іонів Купруму на синтез лакази відзначають і інші автори (Palmieri, 2000). Додавання цитрату Купруму в середовище для культивування *T. versicolor* 353 призводило лише до дворазового збільшення активності. В дослідях з *G. lucidum* 1900 виявлено, що активність лакази не залежала від використаного джерела Цинку, і була, приблизно, на 60% більшою, порівняно з контролем. Таким чином, іони Цинку в обох формах мають, приблизно, однаковий вплив на синтез лакази міцелієм *G. lucidum* 1900 та *T. versicolor* 353. Слід зазначити, що найвища активність лакази в культуральній рідині *T. versicolor* 353 на середовищі з цитратом Мангану та сульфатом Купруму була на 40% вищою за активність лакази в культуральній рідині *G. lucidum* 1900.

Синтез Манган-залежної пероксидази *T. versicolor* 353 також стимулювався іонами Цинку незалежно від форми. На середовищі з Манганом активність Манган-залежної пероксидази очікувано зростала, приблизно, в 3,7 рази, що підтверджують літературні дані (Lundell, 1994). Водночас, додавання до середовища сульфату Купруму, пригнічувало синтез Манган-залежної пероксидази, а цитрат Цинку, навпаки, підвищував її синтез вдвічі, порівняно з контролем. Було виявлено, що культуральна рідина *G. lucidum* 1900 не проявляє Манган пероксидазної активності на досліджуваних середовищах.

БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД МІЦЕЛІЮ *GANODERMA LUCIDUM* 1900 ТА *TRAMETES VERSICOLOR* 353 НА ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ З ЦИТРАТАМИ МЕТАЛІВ.

Аналіз основних компонентів біомаси міцелію *G. lucidum* 1900, культивованого на середовищі з різними джерелами Цинку, свідчить про те, що цитрат та сульфат Цинку рівною мірою впливають на кількість сирого протеїну та загальних вуглеводів. В обох випадках було зафіксовано

збільшення вмісту сирого протеїну в біомасі *G. lucidum* 1900 на 5%, відносно контролю. Одночасно, зменшувалась кількість загальних вуглеводів у міцелію даного штаму *G. lucidum*. Додавання до живильного середовища цитрату Цинку не впливало на накопичення ліпідів міцелієм *G. lucidum* 1900. Натомість, сульфат Цинку збільшував відсоткову частку ліпідів у біомасі *G. lucidum* 1900 майже вдвічі, порівняно з контрольним середовищем і з середовищем з цитратом Цинку. Водночас, відсоток зольних елементів в міцелію *G. lucidum* 1900 суттєво скорочувався під дією сульфату Цинку, порівняно з контролем. Цитрат та сульфат Цинку певною мірою пригнічували синтез ендополісахаридів.

Результати біохімічного дослідження складу міцелію *T. versicolor* 353, культивованого на середовищі з різними джерелами Цинку, Мангану та Купруму, свідчить про те, що цитрати та сульфати цих елементів незначною мірою збільшують відсоток сирого протеїну та зменшують вміст загальних вуглеводів. Вміст зольних елементів у всіх варіантах дослідження збільшувався приблизно на 35%, порівняно з контролем.

Вміст ліпідів у міцелію *T. versicolor* 353, під дією обох форм Цинку, збільшувався, приблизно, на 70%, порівняно з контролем. На середовищі з цитратом Мангану майже вдвічі збільшувався відсоток загальних ліпідів у біомасі *T. versicolor* 353. Сульфат Мангану не впливав на цей показник. Внесення до середовища сульфату Купруму інгібувало синтез загальних ліпідів у біомасі *T. versicolor* 353 на 32,6%, відносно контролю. У той же час, цитрат Купруму не впливав на цей процес.

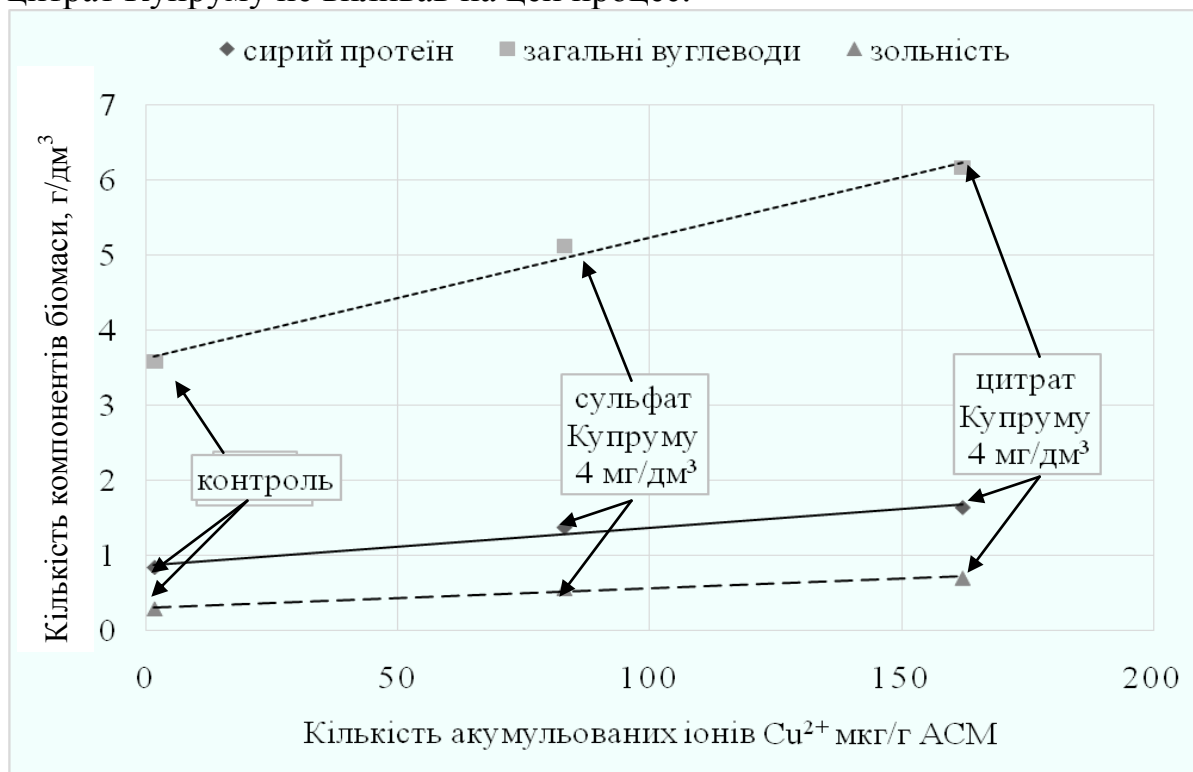


Рис. 1. Залежність складу біомаси *Trametes versicolor* 353 від кількості акумульованих міцелієм іонів Купруму на різних живильних середовищах.

Було виявлено пряму залежність між кількістю акумульованих міцелієм *T. versicolor* 353 іонів Купруму та синтезом сирого протеїну, загальних вуглеводів та накопиченням зольних елементів (рис. 1). Попередньо нами були встановлені прямі залежності між акумуляцією іонів Купруму з одного боку і синтезом біомаси *T. versicolor* 353 та ступенем використання джерел Карбону (глюкози) та Нітрогену – з іншого боку. Взаємозв'язок між цими процесами та процесом накопичення іонів Купруму, очікувано, відобразився і на процесах синтезу сирого протеїну, загальних вуглеводів та ендополісахаридів. Відповідно, показники синтезу даних компонентів зростали прямопропорційно зі збільшенням їх продуктивності та загальним вмістом іонів Купруму в міцелію *T. versicolor* 353. У свою чергу, ці факти доводять, що синтез окремих компонентів біомаси та процес акумуляції зольних елементів прямо залежить від кількості акумульованих з середовища іонів Купруму, а отже, від їхньої біологічної доступності. Результати нашого дослідження демонструють, що цитрат Купруму має більшу біодоступність, ніж сульфат Цинку, за умов однакової концентрації в середовищі по іонам Купруму.

Раніше нами було показано, що на середовищі з цитратами зазначених металів загальний вихід по біомасі міцелію на одиницю об'єму живильного середовища (продуктивність) був значно вищим, ніж на контрольному середовищі та середовищі з сульфатом відповідного елемента. Зважаючи на ці дані, варто відзначити, що продуктивність за окремими компонентами (сирий протеїн, загальні ліпіди, тощо) теж зазнала певних змін. Так, процес культивування *T. versicolor* 353 на живильному середовищі з цитратом Купруму характеризувався найбільшими показниками приросту біомаси, сирого протеїну та загальних вуглеводів. Додавання цитрату Цинку до живильного середовища для культивування *T. versicolor* 353 найкращим чином впливало на збільшення продуктивності за загальними ліпідами. Найвища продуктивність *T. versicolor* 353 за ендополісахаридами спостерігалася на середовищі з цитратом Мангану. Процес культивування *G. lucidum* 1900 на середовищі з цитратом Цинку характеризувався суттєвим збільшенням продуктивності за біомасою, сирим протеїном, загальним вуглеводам та екзополісахаридам.

Вплив цитратів металів на амінокислотний склад *Trametes versicolor* 353 та *Ganoderma lucidum* 1900. Додавання до середовища Цинку змінювало амінокислотний склад біомаси *G. lucidum* 1900, але цитрат та сульфат Цинку по-різному впливали на ці зміни. Так, обидві форми Цинку зменшували вміст серину в міцелію. Але на середовищі з сульфатом Цинку його частка зменшувалася на 18,7%, відносно контролю, а на середовищі з цитратом Цинку – на 28,7%, відносно контролю. В той же час, у міцелію *G. lucidum* 1900, культивованому на середовищі з сульфатом Цинку, збільшувався відсоток проліну та зменшувався вміст тирозину, відносно контролю. На середовищі з цитратом Цинку, відсоток проліну та тирозину в біомасі *G. lucidum* 1900 статистично не відрізнявся від контрольного показника. Натомість, цитрат Цинку, на відміну від сульфату

Цинку, збільшував кількість гістидину, фенілаланіну, ізолейцину та лізину і зменшував вміст аргініну, порівняно з контрольним дослідом В цілому, в міцелію *G. lucidum* 1900 на середовищі з цитратом Цинку збільшувався відсоток незамінних амінокислот, порівняно з контролем, на відміну від сульфату Цинку, який не впливав на цей показник. Враховуючи загальне збільшення біомаси *G. lucidum* 1900 та зростання частки сирого протеїну в ній, можна стверджувати, що використання цитрату Цинку є доцільним для отримання біологічно активних добавок на основі біомаси *G. lucidum* 1900, збагачених незамінними амінокислотами.

У дослідах з *T. versicolor* 353 було показано, що цитрат та сульфат Цинку різною мірою впливають на кількість серину, гліцину та лізину. Так, вміст серину в міцелію *T. versicolor* 353, культивованому на середовищі з сульфатом Цинку, збільшувався на 47,9%, на середовищі з цитратом Цинку – на 55,8%, відносно контрольного середовища. Водночас, збільшувалася і концентрація гліцину в біомасі: на 23,5% (середовище з цитратом Цинку) та на 13,2% (середовище з сульфатом Цинку). Концентрація лізину в міцелію *T. versicolor* 353 зменшувалася на 19,4% на середовищі з цитратом Цинку та на 12,4% на середовищі з сульфатом, порівняно з контролем.

Цитрат та сульфат Мангану різною мірою впливали на вміст серину, проліну, лізину та метіоніну. Суттєво збільшувалася кількість метіоніну в біомасі *T. versicolor* 353 на середовищі з сульфатом Мангану: в 5,4 рази, відносно контролю.

Цитрат Купруму та сульфат Купруму не впливали на амінокислотний склад міцелію *T. versicolor* 353 і, відповідно, відсоток всіх незамінних амінокислот залишався на одному рівні з контрольним значенням. Підкреслимо, що ці дані свідчать, що вихід незамінних амінокислот на одиницю використаного середовища збільшується зі збільшенням продуктивності по сирому протеїну. Тобто, на середовищі з цитратом Купруму спостерігали збільшення на 94,0%, а на середовищі з сульфатом Купруму – на 63,1%.

Жирнокислотний склад міцелію *G. lucidum* 1900 та *T. versicolor* 353 на ГПД середовищах з різними цитратами металів.

У ході біохімічного дослідження, у міцелію *G. lucidum* 1900, культивованого на контрольному живильному середовищі без Цинку, ідентифіковано 10 жирних кислот: меристимову (C:14), пентодеканову (C15:0), пальмітинову (C16:0), цис- і транс- форми пальмітолеїнової (C16:1), маргарінову (C17:0), стеаринову (C18:0), олеїнову (C18:1), лінолеву (C18:2) та лігноцеринову (C24:0). Домінуючими жирними кислотами в біомасі *G. lucidum* 1900 були пальмітинова (22%), олеїнова (38%) та лінолева (27%), вміст яких не змінювався при додавання до середовища цитрату або сульфату Цинку. Єдиною жирною кислотою, вміст якої в біомасі *G. lucidum* 1900 зростав під дією цитрату Цинку, була стеаринова кислота. Так, відсоток цієї жирної кислоти ($6,17 \pm 0,15\%$) від загальної суми жирних кислот на середовищі з цитратом Цинку був в 3,7 рази більшим, ніж в контрольному досліді, та в 5,2 рази більшим, ніж у досліді з сульфатом Цинку. Це

збільшення відбувалося за рахунок зменшення кількості мінорних жирних кислот. У результаті визначення жирнокислотного складу міцелію *T. versicolor* 353 на контрольному середовищі ми ідентифікували 8 жирних кислот: пентодеканову, пальмітинову, пальмітолеїнову, маргарінову, стеаринову, олеїнову, цис- і транс- форми лінолевої. Частка пальмітинової, олеїнової та цис- форми лінолевої кислоти складала більш, ніж 90% від загальної суми жирних кислот. У міцелію, культивованому на середовищі з сульфатом Купруму, не було виявлено транс- форми лінолевої кислоти, а на середовищі з цитратом Купруму не були виявлені пальмітолеїнова, маргарінова та транс- форма лінолевої кислоти. Іони Цинку, не залежно від форми, зменшували кількість стеаринової кислоти, приблизно на 65%, відносно контролю, а вміст пальмітолеїнової – зменшувався втричі. Обидві форми Мангану зменшували кількість стеаринової кислоти, але більшою мірою, ніж Цинк – приблизно в 2,4 рази, порівняно з контролем. Натомість, кількість пентодеканової кислоти зростала незалежно від джерела Мангану.

Вплив цитрату Цинку на вміст ганодерових кислот у міцелію *Ganoderma lucidum* 1900. У нашому дослідженні було виявлено, що цитрат Цинку суттєво збільшує відсоткову частку ганодерових кислот у біомасі *G. lucidum* 1900. На живильному середовищі з цитратом Цинку в міцелію *G. lucidum* 1900 їх було вдвічі більше, ніж на контрольному середовищі. Додавання до живильного середовища сульфату Цинку не впливало на вміст ганодерових кислот у біомасі. Відповідно, продуктивність синтезу ганодерових кислот на середовищі з цитратом Цинку збільшувалася на 162,1%, порівняно з контролем.

Моносахаридний склад міцелію *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 на ГПД середовищах з різними цитратами металів. Аналіз вуглеводного складу біомаси *T. versicolor* 353, культивованого на середовищі з солями Купруму, Мангану та Цинку в органічній та неорганічній формі, свідчить про те, що цитрати та сульфати досліджених металів різною мірою впливають на якісний та кількісний склад моносахаридів та поліолів у міцелію.

Отримані нами результати свідчать про те, що у всіх дослідних варіантах домінуючим моносахаридом у складі загальних вуглеводів *T. versicolor* 353 була глюкоза (табл. 1). Зазначимо, що жоден з сульфатів досліджених металів не впливав на відсоток глюкози в міцелію *T. versicolor* 353 (табл. 1). У той же час, цитрати цих металів змінювали її вміст у біомасі, що свідчить про активізацію внутрішньоклітинних енергетичних процесів. Це узгоджується з попередніми даними, які продемонстрували, що цитрати Мангану, Купруму та Цинку більш ефективно стимулюють синтез біомаси *T. versicolor* 353, ніж відповідні сульфати металів. Зазначимо, що галактоза – єдиний моносахарид, на відсоток якого в міцелію *T. versicolor* 353 не впливав жоден досліджений цитрат або сульфат металу (табл. 1). Цитрат Мангану збільшував вміст манози на 40%, а цитрат Цинку зменшував кількість цього моносахариду майже вдвічі (табл. 1). Відомо, що гриби синтезують манозу з глюкози (Valentine et al., 1978). Таким чином, зменшення синтезу манози та збільшення концентрації глюкози в міцелію *T. versicolor* 353 під дією

цитрату Цинку можна пояснити впливом останнього на активність ферментів, залучених до шляху біосинтезу манози. Ці дані узгоджуються також з тим, що в біомасі *T. versicolor* 353, культивованого на середовищі з цитратом Цинку, не було виявлено фукози, біосинтез якої пов'язаний з манозою (Ren et al., 2010). Таким чином, цитрат Цинку пригнічував синтез манози з глюкози, що призводить до накопичення останньої та до зниження концентрації, як манози, так і фукози. Одночасно, ми спостерігали протилежну картину в дослідах з цитратом Мангану: зменшення концентрації глюкози призводило до накопичення манози та незначного збільшення концентрації фукози, порівняно з контролем. Необхідно підкреслити, що сульфат Цинку та сульфат Мангану не викликали аналогічних змін, що свідчить про різну біологічну активність цитратної та сульфатної форми цих металів.

Таблиця 1.

Вуглеводний склад міцелію *T. versicolor* 353, культивованого в умовах глибинної культури на ГПД середовищі з додаванням цитратів або сульфатів різних металів

Вуглеводи % загальної кількості	контроль	Сульфат Мангану	Цитрат Мангану	Сульфат Цинку	Цитрат Цинку	Сульфат Купруму	Цитрат Купруму
Рибоза	–	0,53±0,05a	0,28±0,04a	–	–	–	0,63±0,05a
Фукоза	0,56± 0,10	0,58± 0,05	0,74±0,05a	0,64± 0,05	–	0,76±0,06a	0,66± 0,05
Ксилоза	0,66± 0,12	0,66± 0,06	0,68± 0,04	0,67± 0,07	–	0,86± 0,07a	0,78± 0,07
Маноза	5,39 ±0,59	5,94 ±0,51	7,59±0,61a	5,66 ±0,59	2,94±0,48a	6,02 ± 0,58	6,18± 0,51
Глюкоза	91,52±1,21	90,30±1,04	88,92±0,9a	91,10±1,12	95,65±0,8a	90,40±0,99	89,00±1,0a
Галактоза	1,87± 0,40	1,98± 0,37	1,79± 0,23	1,93± 0,41	1,42 ± 0,40	1,97± 0,28	1,91± 0,26
Манітол	–	–	–	–	–	–	0,42±0,03a
Сорбітол	–	–	–	–	–	–	0,41±0,04a

Примітки:

a - достовірна ($P < 0,05$) різниця порівняно з контролем;

– відповідний моносахарид чи поліол не виявлен

Поява манітолу у біомасі *T. versicolor* 353 на середовищі з цитратом Купруму можна пояснити тим, що іони Cu^{2+} підвищують активність манітолдегідрогінази (Lee, 2007), яка приймає участь у процесі синтезу цього поліолу. Відзначимо, що гриби використовують манітол як осморегуляторний компонент при абіотичному стресі (Jennings et al., 1985; Stirk et al., 2010), а також у якості енергетичного депо та депо атомів Карбону.

Вплив цитратів металів на вміст цитокінінів у біомасі *Ganoderma lucidum* 1900 і *Trametes versicolor* 353.

Вперше в біомасі *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 виявлені фітогормони, що належать до групи цитокінінів. Максимальна концентрація загальних цитокінінів у біомасі *T. versicolor* 353 отримана на середовищі з цитратом Цинку (Zn^{2+} 1 мг/дм³) і становила 1092 нг/г маси сирової речовини, що в 3,4 рази більше, порівняно з контрольним дослідом. Максимальна концентрація цитокінінів у біомасі *G. lucidum* 1900 спостерігалася на середовищі з сульфатом Цинку (Zn^{2+} 1 мг/дм³) – 844 нг/г маси сирової речовини, що в 3,5 рази більше, ніж на контрольному середовищі. Виявлено, що всі використані в дослідженні метали в обох формах (цитратній та сульфатній) стимулювали синтез транс-зеатину та зеатинрибозиду, водночас пригнічуючи синтез цис-зеатину. Отримані дані дали змогу зв'язати протипухлинну активність, асоційовану з функціональними продуктами на основі *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900, з наявністю рибозидних форм цитокінінів у їх біомасі (Casati et al., 2011).

ІМОВІРНІ ШЛЯХИ ВПЛИВУ ЦИТРАТІВ МЕТАЛІВ НА ФІЗІОЛОГІЮ *TRAMETES VERSICOLOR* 353 ТА *GANODERMA LUCIDUM* 1900

Результати, отримані у біохімічному дослідженні біомаси *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900, дали змогу окреслити можливі механізми, що відповідають за більшу біологічну активність цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, серед яких: (I) активація процесів транспорту іонів до клітин та (II) активація певних внутрішньоклітинних процесів. У цьому розділі розглядаються основні ланки біосинтезу амінокислот, жирних кислот та моносахаридів, їх взаємозв'язок та залежність від іонів металів, використаних у дослідженнях. На базі літературних даних та результатів власних досліджень було визначено коло ферментів, які відповідають за серію виявлених змін (індукованих цитратами металів) в моносахаридному, амінокислотному та жирнокислотному складі біомаси досліджених штамів.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлені нові дані, отримані шляхом експериментальних досліджень, і зроблені на їх основі обґрунтування доцільності використання цитратів металів для культивування цінних лікарських грибів *T. versicolor* і *G. lucidum*, висунуті теоретичні положення стосовно механізмів впливу цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, на фізіологію використаних у дослідженні штамів. Вперше досліджено зміни у ростових та фізіологічних характеристиках лікарських грибів *T. versicolor* та *G. lucidum*, що індуковані цитратами металів, отриманих означеним методом.

Для забезпечення комплексного характеру науково-дослідних робіт, пов'язаних з вивченням впливу цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, на біологію *T. versicolor* та *G. lucidum*, здійснене дослідження широкого спектру біохімічних показників, що відображають зміни у процесах синтезу фармакологічно активних сполук (ендо- та екзополісахаридів, ганодерових кислот, цитокінінів). Проведена оцінка змін у

моносахаридному, жирнокислотному та амінокислотному складі біомаси, які відображають загальний стан у фізіології зазначених видів.

1. Доведено, що цитрати Цинку, Мангану та Купруму в дослідях з *T. versicolor* 353, а цитрат Цинку в експерименті з *G. lucidum* 1900, стимулювали синтез біомаси краще, ніж сульфати відповідних металів. Встановлено, що при додаванні до живильного середовища цитратів Купруму та Цинку була отримана найбільша біомаса міцелію *T. versicolor* 353 (8,6 г/дм³) та *G. lucidum* 1900 (9,9 г/дм³), відповідно.

2. Аналіз біомаси *T. versicolor* 353 і *G. lucidum* 1900 за допомогою оптично-емісійної спектроскопії з індукованою зв'язаною плазмою довів вищу біодоступність іонів Купруму в цитратній формі, ніж у сульфатній. Біодоступність іонів Цинку та Мангану суттєво не залежала від форми, в якій мікроелемент вносився до живильного середовища.

3. Вперше виявлено, що цитрат Цинку стимулює синтез екзополісахаридів *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900. Цитрати та сульфати Мангану та Купруму пригнічували синтез екзополісахаридів в обох видів.

4. У культуральній рідині *T. versicolor* 353 було виявлено активність біотехнологічно важливих ферментів лакази та Манган-залежної пероксидази, а в культуральній рідині *G. lucidum* 1900 – лише лакази. Продемонстровано, що найбільша активність лакази та Манган-залежної пероксидази була виявлена при додаванні до живильного середовища для культивування *T. versicolor* 353 цитрату Мангану (Mn^{2+} 1 мг/дм³).

5. Вперше встановлено, що найвища продуктивність *T. versicolor* 353 за сирим протеїном (1,63 г/дм³) отримана на середовищі з цитратом Купруму (Cu^{2+} 4 мг/дм³), що на 94% більше, ніж на контрольному середовищі. Доведено, що цитрат Купруму за цієї концентрації не змінює якісний та кількісний амінокислотний склад біомаси *T. versicolor* 353, порівняно з контролем. Найвища продуктивність *G. lucidum* 1900 за сирим протеїном (2,96 г/дм³) спостерігалася на середовищі з цитратом Цинку (Zn^{2+} 1 мг/дм³), що на 50% більше, порівняно з контрольним середовищем. При даній концентрації цитрату Цинку сума незамінних амінокислот у біомасі *G. lucidum* 1900 збільшувалася, підвищуючи харчову цінність сирого протеїну.

6. Показано, що максимальна продуктивність *T. versicolor* 353 за загальними вуглеводами (6,15 г/дм³) отримана на середовищі з цитратом Купруму (Cu^{2+} 4 мг/дм³), що на 72% більше, відносно контрольного середовища. Найвищий показник продуктивності *G. lucidum* 1900 за загальними вуглеводами (6,17 г/дм³) встановлений на середовищі з цитратом Цинку (Zn^{2+} 1 мг/дм³), що на 20% більше, порівняно з контролем. Виявлено, що найвищий вихід фракції біотехнологічно цінних ендополісахаридів (360 мг/дм³) *T. versicolor* 353 отримано на живильному середовищі з цитратом Мангану в концентрації Mn^{2+} 1 мг/дм³, що на 450% більше, порівняно з контрольним середовищем.

7. Доведено, що цитрат Цинку в концентрації Zn^{2+} 1 мг/дм³ збільшує продуктивність *T. versicolor* 353 за ліпідами на 146%, відповідно до

контролю. У той же час, на даному середовищі зменшується вміст ненасичених жирних кислот у біомасі *T. versicolor* 353. Найбільше зростання продуктивності *G. lucidum* 1900 по ліпідах становило 94,5% і було зафіксовано на середовищі з сульфатом Цинку. Сульфат Цинку не впливав на відсоткову частку ненасичених жирних кислот у біомасі *G. lucidum* 1900.

8. Вперше в біомасі *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 виявлені фітогормони, що належать до групи цитокінінів. Максимальна концентрація загальних цитокінінів у біомасі *T. versicolor* 353 отримана на середовищі з цитратом Цинку (Zn^{2+} 1 мг/дм³) і становила 1092 нг/г маси сирої речовини, що в 3,4 рази більше, порівняно з контрольним дослідом. Максимальна концентрація цитокінінів у біомасі *G. lucidum* 1900 спостерігалася на середовищі з сульфатом Цинку (Zn^{2+} 1 мг/дм³) – 844 нг/г маси сирої речовини, що в 3,5 рази більше, ніж на контрольному середовищі. Виявлено, що всі використані в дослідженні метали в обох формах (цитратній та сульфатній), стимулювали синтез транс-зеатину та зеатинрибозиду, водночас пригнічуючи синтез цис-зеатину.

9. Додавання до живильного середовища цитрату Цинку в концентрації Zn^{2+} 1 мг/дм³ підвищує вміст ганодерових кислот у міцелію *G. lucidum* 1900 на 104%, відносно контролю, до 543 мкг/г абсолютно сухої маси міцелію.

10. Досліджені та описані зміни, індуковані зазначеними цитратами металів та відповідними сульфатами, на вміст у міцелію *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 ендополісахаридів, ганодерових кислот, цитокінінів, амінокислотного, жирнокислотного та моносахаридного складу біомаси цих лікарських видів. Аналіз отриманих даних дав змогу визначити вірогідні біохімічні та фізіологічні механізми, що пояснюють різну дію цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології.

11. Доведено доцільність використання цитратів металів для підвищення продуктивності цінних лікарських грибів *T. versicolor* 353 та *G. lucidum* 1900 за біомасою, сирим протеїном, загальними ліпідами, загальними вуглеводами, ендо- та екзополісахаридами, ганодеровими кислотами, цитокінінами та для підвищення синтезу біотехнологічно важливих ферментів – лакази та Манган-залежної пероксидази.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових вітчизняних та іноземних виданнях:

1. Аль-Маалі, Г. А. Вплив цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, на ріст штамів лікарських макроміцетів *Ganoderma lucidum* 1900 і *Trametes versicolor* 353 / Г. А. Аль-Маалі // Український ботанічний журнал. – 2015. – Т. 72, № 4. – С. 393 – 397. (Здобувачем самостійно проведено експеримент, проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).
2. Аль-Маалі Г. А. Вплив сульфатів та цитратів металів на вуглеводний склад біомаси лікарського гриба *Trametes versicolor* (Polyporales, Polyporaceae) // Г. А. Аль-Маалі, Н. А. Бісько, А. М. Остапчук // Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія. Медицина. – 2016. – Т.

- 7, № 1. – Р. 32 – 36. (Здобувачем разом зі співавторами сплановано та проведено експеримент, самотійно отримано біомасу та проведена пробопідготовка препаратів для подальшого аналізу, проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).
3. **Аль-Маалі Г. А.** Вплив сульфату та цитрату міді на склад біомаси лікарського гриба *Trametes versicolor* (Polyporales, Polyporaceae) / Г. А. Аль-Маалі, Н. А. Бісько, А. М. Остапчук // Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія. Екологія. – 2016. – Т. 24, № 1. – С. 119 – 123. (Здобувачем разом зі співавторами сплановано та проведено експеримент, самотійно отримано біомасу та проведена пробопідготовка препаратів для подальшого аналізу, проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).
 4. **Al-Maali G. A.** The effect of citrate and sulfate of different metals on the biomass composition of medicinal mushroom *Trametes versicolor* (L.) Lloyd / G. A. Al-Maali, N. A. Bisko, A. M. Ostarchuk // Chornomors'k. bot. z. – 2016. – Vol. 12, № 1. – Р. 64 – 71. (Здобувачем разом зі співавторами сплановано та проведено експеримент, самотійно отримано біомасу та проведена пробопідготовка препаратів, проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).
 5. **Al-Maali G. A.** The effect of zinc citrate and zinc sulfate on the growth and biomass composition of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. / G. A. Al-Maali, N. A. Bisko, A. M. Ostarchuk // Микологія и фитопатологія – 2016. – Vol. 50, №5. – Р. 313 – 317. (Здобувачем разом зі співавторами сплановано та проведено експеримент, самотійно отримано біомасу та проведена пробопідготовка препаратів, проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).
 6. **Vedenicheva N. P.** Endogenous cytokinins in medicinal Basidiomycetes mycelial biomass / N. P. Vedenicheva, **G. A. Al-Maali**, N. Y. Mytropolska, O. V. Mykhaylova, N. A. Bisko, I. V. Kosakivska // Biotechnologia Acta – 2016. – Vol. 9, № 1. – Р. 55 – 63. (Здобувачем самотійно отримано біомасу досліджуваних штамів, разом зі співавторами сплановано та проведено експеримент, проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).

Статті в інших виданнях:

7. **Al-Maali G. A.** The Influence of the Metals Citrates, Obtained Using Aquanano Technologies, On the Biomass Production of Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst / G. Al-Maali, N. Bisko, K. Mustafin, N. Akhmetsadykov, Z. Suleimenova, Z. Rakhmetova // International Journal of Engineering Research and Applications. – 2014. – Vol. 4, № 9. – С. 1 – 4. (Здобувачем самотійно сплановано та проведено експеримент, разом зі співавторами проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).
8. **Al-Maali G. A.** The influence of the manganese citrates, obtained using aquanano technologies, on the biomass production of medicinal mushroom *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. / G. Al-Maali, N. Bisko, K. Mustafin,

N. Akhmetsadykov, Z. Maskeyeva, Z. Rakhmetova, Z. Suleimenova // International Journal of Engineering Research and Applications. – 2014. – Vol. 4, № 9. – С. 22 – 25. (Здобувачем самостійно сплановано та проведено експеримент, разом зі співавторами проаналізовано й узагальнено результати, підготовлено матеріали до публікації).

Матеріали наукових конференцій:

9. **Аль-Маалі Г. А.** Ріст біомаси лікарського базидіального гриба *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst під впливом цитрату марганцю, отриманого за допомогою наноакватехнологій / Г. А. Аль-Маалі, Ю. І. Огородник, Г. С. Литвинов // матеріали VIII Всеукр. наук. практик. конф., присвяченій 200-й річниці з дня народження Т.Г.Шевченка., [“Біотехнологія XXI століття”] (Київ, 25 квітня 2014) – 2014. – С. 13.
10. **Аль-Маалі Г. А.** Влияние цитрата цинка, полученного с помощью аквананотехнологий, на прирост биомассы мицелия лекарственных базидиальных грибов в культуре / Г. А. Аль-Маалі // Материалы междунар. науч. конф. [“Успехи медицинской микологии”] (Москва, 8-10 апреля 2014) – 2014. – Т. 12. – С. 210 – 211.
11. **Огородник Ю. І.** Вплив цитрату марганцю, отриманого за допомогою аквананотехнологій, на приріст біомаси *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. та *Trametes versicolor* (L.) Lloyd / Ю. І. Огородник, **Г. А. Аль-Маалі** // матеріали міжнар. наук. практик. конф. [“Актуальні питання сучасної науки”] (Одеса, 25-26 квітня 2014). – 2014. – Р. 29 – 33.
12. **Аль-Маалі Г.А.** Вплив цитратів металів, отриманих методом аквананотехнологій, на ріст цінного лікарського базидіального гриба *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. / Г. А. Аль-Маалі // Матеріали міжнар. конф. молодих вчених. [“Актуальні проблеми ботаніки та екології”] (Полтава, 15-20 вересня 2015). – 2015. – С.
13. **Аль-Маалі Г.А.** Влияние цитрата марганца, полученного с помощью аквананотехнологий, на прирост биомассы мицелия лекарственных базидиальных грибов в культуре / Г. А. Аль-Маалі // Материалы междунар. науч. конф. [“Современная микология в России”] (Москва, 14-15 апреля 2015). – 2015. – Т. 5 – С. 267 – 269.

АНОТАЦІЯ

Аль-Маалі Г.А. Вплив цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, на біологію *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. і *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. у культурі. – Рукопис. – Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.21 – мікологія. – Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ, 2017.

Дисертація присвячена дослідженню впливу цитратів Мангану, Феруму, Цинку та Купруму, синтезованих методом аквананотехнології, на біологію цінних лікарських грибів *Trametes versicolor* і *Ganoderma lucidum* в культурі та їх біосинтетичні властивості. Представлені нові дані, отримані шляхом експериментального дослідження широкого спектру біохімічних показників, що відображають зміни у процесах синтезу фармакологічно активних сполук

(ендо- та екзополісахаридів, ганодерових кислот, цитокінінів) та біотехнологічно важливих ферментів (лакази та Манган-залежна пероксидази). Вперше показано, що біологічна дія цитратів Купруму, Цинку та Мангану (синтезованих методом аквананотехнології) на моносахаридний, амінокислотний та жирнокислотний склад міцелію лікарських грибів *T. versicolor* та *G. lucidum* суттєво відрізняється від дії сульфатів відповідних металів на зазначені показники. На основі отриманих експериментальних даних сформульовані теоретичні положення щодо вірогідних біохімічних та фізіологічних механізмів, що пояснюють різну дію цитратів металів, синтезованих методом аквананотехнології.

Додатковим результатом експериментальної роботи стало встановлення наявності раніше не виявлених у міцелію *T. versicolor* та *G. lucidum* фітогормонів, що відносяться до групи цитокінінів, які демонструють широкий спектр протипухлинних властивостей. За результатами досліджень доведено можливість практичного використання цитратів металів, отриманих методом аквананотехнології, для культивування цінних лікарських грибів з метою підвищення синтезу біотехнологічно важливих сполук.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, Купрум, Манган, Цинк, аквананотехнології, цитокініни, полісахариди, ганодерові кислоти, лаказа, Манган-залежна пероксидаза, біохімічний склад.

АННОТАЦИЯ

Аль-Маали Г.А. Влияние цитратов металлов, полученных с помощью аквананотехнологии, на биологию *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. и *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. в культуре. – Рукопись. – Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.21 – микология. – Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию влияния цитратов марганца, железа, цинка и меди, синтезированных методом аквананотехнологии, на биологию ценных лекарственных грибов *Trametes versicolor* и *Ganoderma lucidum* в культуре и на их биосинтетические свойства. Представлены новые данные, полученные в ходе экспериментального исследования широкого спектра биохимических показателей, отображающих изменения в процессах синтеза соединений с лекарственными свойствами (эндо- и экзополисахаридов, ганодеровых кислот, цитокининов) и важных для биотехнологии ферментов (лакказы и марганец-пероксидазы). Впервые показано, что биологическое действие цитратов меди, цинка и марганца (полученных методом аквананотехнологии) на моносахаридный, аминнокислотный и жирнокислотный состав мицелия лекарственных грибов *T. versicolor* и *G. lucidum* существенно отличается от действия сульфатов соответствующих металлов. На основе полученных данных сформулированы теоретические положения о возможных биохимических и физиологических механизмах действия цитратов металлов, синтезированных данным методом.

Дополнительным результатом экспериментальной работы стало установление ранее невыявленных в мицелии *T. versicolor* и *G. lucidum*

фитогормонов из группы цитокининов, которые обладают противоопухолевыми свойствами. В результате исследований доказана возможность практического использования цитратов металлов, полученных методом аквананотехнологии, для культивирования ценных видов лекарственных грибов с целью повышения синтеза биологически активных соединений.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, медь, марганец, цинк, аквананотехнологии, цитокинины, полисахариды, ганодеровые кислоты, лакказа, марганец-пероксидаза, биохимический состав.

SUMMARY

Al-Maali G. A. The influence of the metals citrates, obtained using aquananotechnology, on the biology of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. and *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. in culture. – Manuscript. – PhD thesis, Speciality 03.00.21 – Mycology. – M. G. Kholodny Institute of Botany National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

The dissertation deals with the study of influence of the metals citrates (copper, manganese, iron and zinc), obtained using aquananotechnology, on the biology of *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in culture and on their biosynthetic properties. The highest yield of crude protein, total carbohydrates and biomass of *T. versicolor* was obtained on a liquid medium with the copper citrate. The adding of zinc citrate in a medium for cultivation of *T. versicolor* enhanced productivity of total lipids, but changed fatty acids content of biomass. The zinc citrate increased biosynthesis of cytokinins and exopolysaccharides of *T. versicolor* more better than other citrates of metals, used in this study. The highest yield of endopolysaccharides was received on medium with the manganese citrate. Also, the adding of manganese citrate in a medium enhanced fermentative activity (laccase and manganese peroxidase). Only the zinc citrate raised the productivity of biomass, crude protein, total carbohydrates and exopolysaccharides of *G. lucidum*. Total amount of essential amino acids in this mycelium of *G. lucidum*, obtained on medium with the zinc citrate, was increased. Also, zinc citrate stimulated biosynthesis of ganoderic acids. Thus, amount of ganoderic acids raised by 2 times, relative to control medium.

The data, obtained in biochemistry analyze of monosaccharides, amino acids and fatty acids composition of biomass of these medicinal mushrooms, was shown that the influence of the metals citrates on these parameters differ from the influence of sulfates of appropriate metals. These results allow to formulate the theoretical principles of probable biochemical and physiological mechanisms of effect of the metal citrates, obtained using aquananotechnologies. The data demonstrate the possibility of practical use of the metals citrates, obtained using aquananotechnology, for cultivation of these medicinal mushrooms and enhance their biosynthetic properties.

Key words: *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, copper, manganese, zinc, aquananotechnologies, cytokinins, polysaccharides, ganoderic acids, laccase, manganese peroxidase, biochemical composition.

Підписано до друку 26.03.2017 р. Формат 60x90/16.
Папір офісний. Гарнітура Таймс Нью Роман.
Ум. друк. арк. 1. Тираж 100. Зам. № 2051

Надруковано ФОП «Черенок К.В.»
Свідоцтво В02 №353856 від 25.09.2006 р.
м. Київ, вул. Пушкінська, 45/2
тел.: (044) 235-81-92, 228-45-05