

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

ДЗИГУН ЛАРИСА ПЕТРІВНА



УДК 582.284+579.222

**БІОЛОГІЯ БАЗИДІЄВИХ МАКРОМІЦЕТІВ *LAETIPORUS SULPHUREUS*
(BULL.) MURRILL ТА *CERIOPORUS SQUAMOSUS* (HUDS.) QUÉL. В
КУЛЬТУРІ.**

03.00.21- МІКОЛОГІЯ

03 - БІОЛОГІЯ

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук (доктора філософії)

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України «Київського політехнічного інституту імені Ігоря Сікорського».

Науковий керівник:

член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України
ДУДКА Ірина Олександрівна

Офіційні опоненти:

член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
ШВАРТАУ Віктор Валентинович,
Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, завідувач відділу
фізіології живлення рослин

кандидат біологічних наук, доцент,
БОЙКО Ольга Анатоліївна,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України, завідувач
кафедрою фізіології, біохімії рослин та
біоенергетики факультету захисту
рослин, біотехнологій та екології

Захист відбудеться «30» листопада 2020 року о 16-00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.211.01 Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України за адресою: 01024, 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 «___» жовтня 2020 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
канд. біол. наук



С.О. Нипорко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останнім часом спектр базидієвих макроміцетів з метою їх практичного використання, як продуцентів біологічно активних речовин для різних галузей, розширюється і поповнюється новими видами. Зокрема перспективними та доступними у цьому напрямку є дереворуйнівні базидіоміцети з огляду на відомості про їх використання в традиційній медицині різних народів Світу, наявність різних біологічно активних речовин та можливість використання для їх культивування відходів сільського господарства, переробної та деревообробної промисловості (Wasser, 2002; Биологические особенности..., 2012; Han, 2015). До цієї групи грибів належать і види *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill та *Cerioporus squamosus* (Huds.) Quéf.

Ці два види ксилотрофних базидієвих грибів за останні десятиріччя в багатьох країнах Світу розглядаються як лікарські, що пов'язано з даними про наявність у їх складі речовин з імуномодулювальною, протівірусною, протипухлинною, гіпоглікемічною та гепатопротекторною активностями (Дзигун, 2011; Acharya, 2015; Khatua, 2017; Sułkowska-Ziaja, 2018; Bulam, 2019; Patocka, 2019; Elkhateeb, 2020). Формування в період вегетації масивних, добре помітних плодових тіл, які їстівні у молодому віці та в деяких європейських країнах вважаються як делікатесні, дає можливість розглядати їх перспективними продуцентами харчового та кормового білку. Наявний у цих видів грибів ферментний комплекс визначає можливість їх використання у переробній та харчовій промисловості, при розробці природоохоронних технологій, спрямованих на очистку оточуючого середовища від забруднення.

Таким чином є **актуальним** дослідження біологічних особливостей видів *L. sulphureus* та *C. squamosus* в умовах культури для штамів, виділених з плодових тіл, зібраних на території України, що дозволить накопичити необхідну інформацію для ідентифікації їх в культурі та розробки технології штучного вирощування з метою отримання міцеліальної біомаси і біологічно активних речовин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського відповідно до планів НДР: за темами № 2033п “Створення лінії інноваційних біологічно активних продуктів для медицини, харчової промисловості та сільського господарства”, № 25.5/086 Ф25/644-2007 “Закономірності росту базидіальних грибів в глибинній та поверхневій культурі” (№ держреєстрації 0107U008329), №М/246-2003 “Дослідження модифікованих ферментних систем для альтернативних текстильних фінішних процесів” та №ДП/325-2003 “Розробка технології гідролітичного поліферментного препарату мікробного походження”.

Мета роботи – дослідити особливості біології штамів лікарських базидіоміцетів *L. sulphureus* та *C. squamosus* в культурі та з'ясувати можливості їх використання як біотехнологічних об'єктів.

Для досягнення мети були поставлені такі **завдання**:

1. Одержати чисті культури *L. sulphureus* та *C. squamosus* з природного матеріалу, зібраного на території України.
2. Вивчити культурально-морфологічні особливості штамів *L. sulphureus* та *C. squamosus*.
3. Дослідити вплив джерел карбону та нітрогену на накопичення біомаси штамів *L. sulphureus* та *C. squamosus*.
4. Вивчити вплив рослинних домішок на накопичення біомаси та показники культуральної рідини при глибинному культивуванні штамів *L. sulphureus*.
5. Дослідити біологічно активні речовини (лектини та каротиноїди) та антимікробну активність штамів *L. sulphureus*.
6. Дослідити можливості застосування культуральної рідини та міцелію *L. sulphureus* для обробки тканин.

Об'єкт дослідження. Культури ксилотрофних лікарських базидіоміцетів *L. sulphureus* та *C. squamosus*.

Предмет дослідження зміни біологічних особливостей штамів *L. sulphureus* та *C. squamosus* в умовах культури.

Методи дослідження: мікологічні, фізіолого-біохімічні, електронно-мікроскопічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів.

При виконанні дисертаційної роботи отримані результати експериментальних досліджень про біологічні властивості 26 штамів 2 видів базидієвих макроміцетів *L. sulphureus* і *C. squamosus* у чистій культурі. Ця інформація поповнить дані по досліджених штамів видів *L. sulphureus* і *C. squamosus*, що зберігаються в Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України.

Вперше досліджено ріст і морфологію колоній 17 штамів *L. sulphureus* та 9 штамів *C. squamosus* на 5 агаризованих живильних середовищах різного складу за різних умов культивування. Визначені морфолого-культуральні характеристики міцелію досліджених видів на різних живильних середовищах і ростові показники можна використовувати як додаткові таксономічні ознаки при ідентифікації культур у вегетативній стадії розвитку.

Отримано нові відомості про спектр екзоферментів для досліджених культур на агаризованих живильних середовищах, що може бути використано при їх ідентифікації. Показано, що у досліджених видів наявні ензими, що характеризують метаболізм вуглеводів (амілаза, целюлаза, ксиланіза), ліпідів (ліпаза), азотних сполук (протеаза, казеїназа, уреаза) та окислювально-відновні процеси.

Для досліджених штамів встановлено найсприятливіші джерела карбону і нітрогену та початкову кислотність живильного середовища. Найсприятливішими для культивування *L. sulphureus* є глюкоза і пептон та початкове значення рН на рівні 6,6, а для *C. squamosus* – фруктоза і пептон та рН 6,9.

Доведена можливість використання відходів сільського господарства та переробної промисловості як компонентів комплексних живильних середовищ

для вирощування *L. sulphureus*, показана перспективність передусім таких домішок, як соєве, горохове та кукурудзяне борошно, крохмаль, вільхова тирса.

Отримано нові дані щодо динаміки аналітичних показників росту *L. sulphureus* на рідких живильних середовищах у глибинній культурі.

Вперше показана перспективність застосування культуральної рідини штаму *L. sulphureus* 1774 для проведення фінішних процесів обробки бавовняних тканин.

Практичне значення одержаних результатів. Здійснено збір плодкових тіл досліджуваних видів, з яких в чисту культуру виділено 13 штамів *L. sulphureus* та 7 штамів *C. squamosus*. Всі чисті культури передано на зберігання у Колекцію культур шапінкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України.

Розроблено способи культивування вегетативного міцелію *L. sulphureus* та *C. squamosus* на агаризованих і рідких живильних середовищах, які можуть бути використані в технологічному процесі для отримання міцеліальної біомаси та метаболітів.

Підібрано склад живильних середовищ, температуру інкубації та умови, за яких культури зберігають життєздатність і не втрачають своїх біологічних властивостей протягом тривалого часу.

Методики, об'єкти та результати роботи використані у навчальному процесі студентів факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського в рамках лекційних і лабораторних занять з дисциплін «Загальна біотехнологія», «Основи мікології», «Біотехнологія грибів» і «Біотехнологія сільськогосподарських виробництв».

Особистий внесок здобувача: Дисертантом самостійно проведено критичний аналіз даних наукової літератури, виконано основний обсяг експериментальних досліджень, аналіз отриманих результатів та статистична обробка експериментального матеріалу, написання рукопису дисертації. Планування основних напрямків роботи, аналіз, узагальнення та обговорення результатів, формування основних положень та висновків, підготовку до друку наукових статей проведено у співпраці з науковим керівником дисертаційної роботи, член-кор. НАН України, проф., д. б. н., завідувачкою відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [І. О. Дудкою]. Вивчення мікроструктури вегетативного міцелію методом СЕМ проведено спільно з співробітниками цього відділу проф., д.б.н. [А. С. Бухало] та с.н.с., к.б.н. О. Б. Михайловою. Антимікробну активність досліджували спільно з співробітниками відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Гемаглютинуючу активність міцелію і культуральної рідини штамів визначали разом з співробітниками відділу фітогормонології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Дослідження ефективності фінішної обробки бавовняних тканин проводились у співпраці з Інститутом текстилю, факультету інженерної механіки, Університету Марибору, Словенія.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені та обговорені на Міжнародній науковій конференції молодих

вчених, аспірантів і студентів “Сучасні методи створення нових технологій та обладнання в харчовій промисловості” (Київ, 2002 р.), II Международной конференции “Методологические основы познания биологических особенностей грибов-продуцентов физиологически активных веществ и пищевых продуктов” (Донецьк, 2002 р.), XVI Congress of European Mycologists (Katsiveli, Yalta, Crimea, Ukraine, 2003), I, IV Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика.» (Київ, 2003 р., Дніпропетровськ, 2008 р.), 3rd International Conference on Textile Biotechnology (Грац, Австрія, 2004 р.), X з'їзді Товариства мікробіологів України (Одеса, 2004 р.), X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах» (Санкт-Петербург, Росія, 2006 р.), Четвертом всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, Росія, 2006 р.), V, VI Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Мінськ-Раков, Білорусь, 2006 р., Мінськ, Білорусь, 2008 р.), Міжнародній науковій конференції «Мікробні біотехнології» (Одеса, 2006 р.), III Міжнародній конференції молодих вчених «Розмаїття живого. Екологія. Адаптація. Еволюція.», присвяченій 100-річчю з дня народження видатного українського ліхенолога М.Ф. Макаревич (Одеса, 2007 р.), юбилейной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М.В.Горленко «Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества» (Москва, Росія, 2008 р.), Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, присвяченій 90-річчю з дня заснування Українського Студентського Наукового Товариства Київського Університету Святого Володимира «Шевченківська весна» (Київ, 2008 р.), 2-ом Съезде микологов России «Современная микология в России» (Москва, Росія, 2008 р.), Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, Росія, 2009 р.), IV Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2009 р.), IV науково-практичній конференції викладачів, студентів та аспірантів, присвяченій «Дню науки ФБТ» Біотехнологія XXI століття (Київ, 2010 р.), IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2015 р.).

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 32 праці, з них 12 статей у періодичних наукових виданнях (2 – у фахових закордонних виданнях, 8 – у фахових виданнях, рекомендованих Міністерством освіти і науки України, 2 статі у інших виданнях) і матеріали тез 20 наукових конференцій.

Структура і обсяг роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, висновків, списку літератури (288 найменувань, з них 147 опубліковано мовами, що використовують латинський алфавіт) і 2 додатків. Загальний обсяг роботи – 191 сторінки. Робота супроводжується додатками (Додаток А. Акт про впровадження; Додаток Б. Список публікацій за темою дисертації). Основна частина дисертації викладена на 128 сторінках, ілюстрована 23 таблицями та 37 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА *LAETIPORUS SULPHUREUS* ТА *CIRIOPORUS SQUAMOSUS* І ОСНОВНІ НАПРЯМКИ ЇХ ДОСЛІДЖЕННЯ

У розділі наведене сучасне систематичне положення досліджених видів. Проведено аналіз літературних даних стосовно морфології, екології, субстратної приуроченості й поширення видів *L. sulphureus* і *C. squamosus* в природі. Систематизовано й узагальнено наявні літературні відомості щодо особливостей росту *L. sulphureus* і *C. squamosus* в культурі. Проаналізований хімічний склад і поживна цінність плодових тіл і міцелію досліджених видів. Охарактеризовані біологічно активні речовини, виділені з плодових тіл і міцелію видів *L. sulphureus* та *C. squamosus*, а також визначені напрямки їх використання у різних галузях. Виходячи з аналізу літературних даних, визначено актуальність власного дослідження.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були 17 штамів виду *L. sulphureus* і 9 штамів виду *C. squamosus* з Колекції культур шапинкових грибів ІВК Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (Колекція культур..., 2016).

Виділення чистої культури здійснювали за стандартними методиками з дотриманням правил асептики (Бухало, 1988; Ершова, 2003; Методы экспериментальной..., 1982).

Дослідження мікроморфології вегетативного міцелію здійснювали з використанням оптичної (Методы экспериментальной..., 1982) та сканувальної електронної мікроскопії (Бухало, 1988; Григанський, 1994).

Дослідження особливостей росту і морфології штамів *L. sulphureus* та *C. squamosus* на агаризованих живильних середовищах здійснювали загально прийнятими методами (Бондарцев, 1954; Бухало, 1988; Ріст окремих видів..., 2000; Stalpers, 1978) на 5 середовищах: сусло-агар (СА), морквяний агар (МА) картопляно-глюкозне середовище (КГА), середовище Норкранс (СН) і середовище Чапека (СЧ) за температур: $4\pm 1^\circ\text{C}$, $22\pm 1^\circ\text{C}$, $28\pm 1^\circ\text{C}$ та $37\pm 1^\circ\text{C}$.

Дослідження росту та життєздатності міцелію штамів *L. sulphureus* та *C. squamosus* здійснювалося на сусло-агарі в діапазоні температур від 30°C до 40°C із кроком 1°C (Граничні температури..., 2011).

Різні групи ферментів виявляли за допомогою якісних реакцій на агаризованих живильних середовищах (Бухало, 1988; Molitoris, 2000).

Для проведення серії експериментів з глибинного культивування та біосинтетичної активності культур *L. sulphureus* та *C. squamosus* використовували рідкі живильні середовища: синтетичне середовище (СС), гліцеринно-соєве середовище (ГСС), глюкозо-пептонне середовище (ГПС), глюкозо-аспарагінове середовище (ГАС), синтетично-соєве середовище (ССС) (Бухало, 1988; Гемагглютинирующая активность..., 2000; Антимикробные

свойства..., 2001). Культивування здійснювали у конічних колбах на кругових качалках при 100 – 150 об/хв. за температури 28°C протягом 7 – 21 доби.

Дослідження потреб штамів у джерелах карбону проводили на середовищі СС, до якого у концентрації еквівалентній карбону в 20 г/дм³ глюкози додавали такі речовини: інουλін, маніт, гліцерин, фруктозу, глюкозу, лактозу, ксилозу, мальтозу, галактозу, сахарозу та крохмаль. Вплив джерел нітрогену проводили на середовищі СС з концентрацією нітрогену еквівалентною 3 г/дм³ NH₄NO₃ у речовинах: гістидин, лейцин, лізин, триптофан, пептон, NaNO₃, NaNO₂ та NH₄Cl (Бухало, 1988). Для дослідження впливу рН на ріст культури середовище СС готували на основі фосфатного буферу у діапазоні рН 4,6 – 7,5 (Рабинович, 1977). Як рослинні домішки до середовища СС випробовували подрібнені до порошкоподібного стану виноградні та яблучні вичавки, лушпиння насіння соняшника, вільхову та соснову тирсу, соєве, горохове та кукурудзяне борошно, зародки пшениці, крохмаль, карбоксиметилцелюлозу. Їх вносили в колби в кількості 1% від об'єму середовища перед стерилізацією.

Під час культивування визначали основні параметри: кількість біомаси міцелію, зміну рН живильного середовища, масові концентрації сухих і редуруючих речовин, масову частку органічних кислот, концентрацію білка з використанням стандартних методики, прийнятих в біохімії і модифікованих до об'єкту досліджень.

Наявність антимікробної активності досліджували методам агарових дисків і методом дифузії в агар (Методы экспериментальной..., 1982). Наявність лектинів встановлювали реакцією гемаглютинації із суб'єктивним оцінюванням результатів і виражали титр найбільшим розведенням розчину, який дає аглютинацію (Луцик, 1981). Для встановлення концентрації каротиноїдів у міцелії здійснювали екстракцію етанол-гексанової суміші (1:1), вимірювали оптичну густину в діапазоні $\lambda = 450 - 475$ нм отриманого екстракту і перераховували на абсолютно суху біомасу міцелію (Valadon, 1969; Mishyn, 2002).

Для оцінки ефективності використання культуральної рідини *L. sulphureus* для фінішних процесів виробництва бавовняних тканин проводили обробку зразків текстилю паралельно з комерційними ферментними препаратами і встановлювали втрату ваги зразка, міцності на злам, еластичності волокон тканин, білизну відповідно до ISO 5081 та ISO 13934-1 та зміну структури волокон тканини.

Обробку результатів здійснювали з використанням статистичних методів та табличного процесору Microsoft Office Excel.

РОЗДІЛ 3 МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ ОЗНАКИ ШТАМІВ *LAETIPORUS SULPHUREUS* І *CERIOPORUS SQUAMOSUS* НА АГАРИЗОВАНИХ СЕРЕДОВИЩАХ ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

Під час вегетативного періоду досліджених видів у 2001 – 2003 роках в чисту культуру було виділено з природних субстратів 13 штамів *L. sulphureus*

та 7 штамів *C. squamosus*, якими поповнено склад Колекції культур шапинкових грибів ІВК. З метою їх верифікації були досліджені культуральні та мікроморфологічні ознаки. Культуральні ознаки досліджували на натуральних (морквяний агар й агаризоване пивне сусло), комплексному (картопляно-глюкозний агар) та синтетичних (Норкранса і Чапека) середовищах.

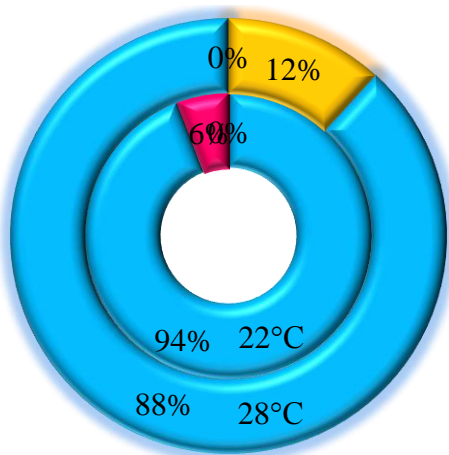
Для штамів *L. sulphureus* було встановлено такі типи міцеліальної колоній: повстяно-борошнистий, шерстистий та пластівчастий з гіфальними пучками, які відзначалися і іншими авторами (Озерова, 2006; Рост и морфологические особенности..., 2005; Stalpers, 1978). Кольорова гама штамів *L. sulphureus* визначалася за шкалою А.С. Бондарцева (Бондарцев, 1954) і коливалася від блідо-пісочної до темно-кремової та шаума, тип колонії значною мірою залежав від складу середовища. Для штамів *C. squamosus* міцеліальна колонія була білою з ватоподібною структурою, яка з часом ставала шкірястою (Stalpers, 1978). Такий тип зберігався на всіх досліджених середовищах, проте інтенсивність росту колонії залежала від складу середовища.

Дослідження мікроструктур міцелію штамів *L. sulphureus* дозволили встановити наявність апікальних конідій, хламідоспор, пряжки на гіфах були відсутні (Макро- и микроморфология..., 2007; Решетников, 1991; Stalpers, 1984). Вегетативний міцелій штамів *L. sulphureus* переважно складається з регулярно септованих, розгалужених, забарлених генеративних гіф, які утворюють численні анастомози та тонкі комунікативні гіфи. Мікроскопічні дослідження міцелію штамів *C. squamosus* дозволили встановити наявність типових для цього виду артроконідій і пряжок медальйонного типу. Встановлена також наявність дендроподібних структур (Бухало, 1988; Petersen, 1997).

Швидкість радіального росту всіх досліджених штамів *L. sulphureus* на СА була вища, ніж на КГА та МА, що відрізняється від даних отриманих Т. Луангарном з колегами та М. Сівулські з колегами, які відзначали більшу швидкість росту якраз на КГА (Optimal conditions..., 2014; The influence of different..., 2009). На середовищі СЧ штами *L. sulphureus* не росли. На середовищі СН ріст штамів *L. sulphureus* був незначний.

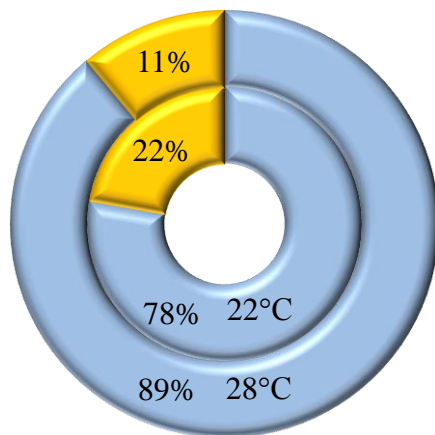
Значення швидкості радіального росту штамів *L. sulphureus* на СА за температури 28°C знаходилося в межах від 5,2 мм/добу до 10,4 мм/добу, що співпадає з даними інших дослідників. За швидкістю радіального росту на еталонному СА штами *L. sulphureus* умовно можна розподілити на дві групи: з високою ($V_r > 10$ мм/добу) – штам 1814 та з середньою (10 мм/добу $\geq V_r \geq 5$ мм/добу) швидкістю росту, до якої належать всі інші штами (рис. 1).

За температур 22°C та 28°C обростання СА, МА та КГА штамами *L. sulphureus* було повним за 6 – 20 діб, а ріст колонії відбувався в залежності від індивідуальних особливостей кожного з досліджуваних штамів. Для більшості штамів *L. sulphureus* не було відзначено значної різниці між значеннями швидкості радіального росту за температур 22 та 28°C.



■ 10-15 мм/доба ■ 5-10 мм/доба ■ 1-5 мм/доба

Рис. 1. Розподіл 17 штамів *Laetiporus sulphureus* за швидкістю радіального росту на агаризованому пивному суслі за температур 22°C та 28°C.



■ 4-6 мм/доба ■ 2-4 мм/доба ■ 0-2 мм/доба

Рис. 2. Розподіл 9 штамів *Cerioporus squamosus* за швидкістю радіального росту на агаризованому пивному суслі за температур 22°C та 28°C.

Для штамів *C. squamosus* є характерним період адаптації до середовища. На СА, КГА та МА ріст міцелію починався на 4–6 добу після інокуляції, а на СН і СЧ на 4–10 добу. Значення швидкості радіального росту штамів *C. squamosus* знаходилися в межах від 0,5 мм/добу до 3,8 мм/добу. Всі штами *C. squamosus* на СА належать до групи з низькою швидкістю радіального росту ($V_r < 5$ мм/добу) (рис. 2), така ж тенденція спостерігається і на інших середовищах. Ріст міцелію штамів *C. squamosus* досліджували за температур 22 та 28°C.

За результатами досліджень відібрано штами *L. sulphureus* 1518, 1772, 1773, 1774 та *C. squamosus* 1826, як такі, що показали одночасно достатньо високу швидкість радіального росту та стабільні морфологічні показники на різних за складом агаризованих живильних середовищах.

Досліджені штами *L. sulphureus* зберігали життєздатність за температур 36, 37 та 38°C. За температури 39°C при подальшому перенесенні в температурні умови 28°C ріст для культур *L. sulphureus* не відновлювався. Тобто температура 38°C може вважатися верхньою граничною температурою для росту міцелію досліджених штамів *L. sulphureus*. Життєздатність штамів *C. squamosus* досліджували в діапазоні за температур від 30°C до 37 °C. За температури 37°C при подальшому перенесенні в температурні умови 28°C ріст для культур *C. squamosus* не відновлювався. Тобто температура 36°C може

вважатися верхньою граничною температурою для росту міцелію досліджених штамів *C. squamosus*.

Отримана інформація щодо комплексу ферментів штамів *L. sulphureus* та *C. squamosus*з ІВК Колекції культур шапинкових грибів. Для досліджених штамів *C. squamosus* виявлено наявність всіх оксидаз, а для штамів *L. sulphureus* – тирозинази та пероксидази. Отримано відомості про наявність основних груп ферментів вуглецевого обміну (амілаза, целюлаза, ксиланаза), азотного (протеаза, казеїназа, уреази) та ліпідного (ліпаза) метаболізмів для досліджених штамів *L. sulphureus* та *C. squamosus*.

РОЗДІЛ 4 ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ МІЦЕЛІЮ ШТАМІВ *LAETIPORUS SULPHUREUS* І *CERIOPORUS SQUAMOSUS* У ГЛИБИННІЙ КУЛЬТУРИ

Найбільш важливими факторами, що зумовлюють отримання значної кількості фізіологічно активної біомаси міцелію грибів, є забезпечення їх доступними для живлення джерелами карбону та нітрогену. Вивчення фізіологічних особливостей штамів *L. sulphureus* 1518, 1772, 1773 і 1774 та штаму *C. squamosus* 1826, які були відібрані на попередніх етапах роботи, здійснювали в глибинній культурі на середовищах з 11 джерелами карбону (інулін, маніт, гліцерин, фруктоза, глюкоза, лактоза, ксилоза, мальтоза, галактоза, сахароза та крохмаль) та 9 джерелами нітрогену (гістидин, лейцин, лізин, триптофан, пептон, нітрат амонію, нітрат натрію, нітрит натрію та хлорид амонію).

Ріст досліджених штамів *L. sulphureus* відбувався на середовищах з усіма дослідженими джерелами карбону і нітрогену (рис. 3 та 4). Для кожного з досліджених штамів *L. sulphureus* можливо відзначити певні штамові особливості у здатності засвоювати використані в дослідженні джерела карбону. Штам *L. sulphureus* 1773 майже однаково накопичував біомасу на середовищах з крохмалем і глюкозою (18,96 і 18,87 г/дм³), з фруктозою і галактозою (10,86 і 10,06 г/дм³), з лактозою і сахарозою (9,39 і 8,94 г/дм³) та з ксилозою і мальтозою (8,07 і 7,95 г/дм³). Для штамів *L. sulphureus* 1772 та 1774 можливо відзначити дещо інші закономірності. Ці два штами накопичували близькі за значенням кількості біомаси на середовищах з глюкозою, гліцерином, фруктозою, сахарозою та ксилозою (штам *L. sulphureus* 1772 від 6,59 до 7,23 г/дм³ і штам 1774 від 4,34 до 4,87 г/дм³) і з галактозою, манітом, мальтозою і лактозою (штам 1772 від 4,12 до 4,46 г/дм³ і штам 1774 від 2,02 до 2,63 г/дм³). Мав свої особливості за цим показником і штам *L. sulphureus* 1518: близькі значення накопичення біомаси відмічені на середовищах з крохмалем, гліцерином і ксилозою (5,8 – 6,5 г/дм³), з мальтозою і інуліном (1,2– 1,5 г/дм³) та з сахарозою, лактозою, фруктозою, глюкозою і галактозою (0,2 – 0,8 г/дм³).

Для всіх досліджених штамів *L. sulphureus* серед використаних джерел нітрогену найбільшому накопиченню біомаси сприяв пептон (рис. 4), на якому цей показник був 4,2 – 15,9 г/дм³. Всі інші використані джерела нітрогену за їхнім впливом на накопичення біомаси штамами *L. sulphureus* можливо розташувати у такій послідовності: лізин (0,7 – 15,3 г/дм³), триптофан (1 –

14,4 г/дм³), нітрат амонію (1,3 – 14,2 г/дм³), хлорид амонію (2,9 – 13,0 г/дм³), лейцин (0,86 – 8,44 г/дм³), гістидин (0,59 – 3,93 г/дм³), нітрат натрію (1,2 – 1,8 г/дм³) та нітрит натрію (1 – 1,32 г/дм³).

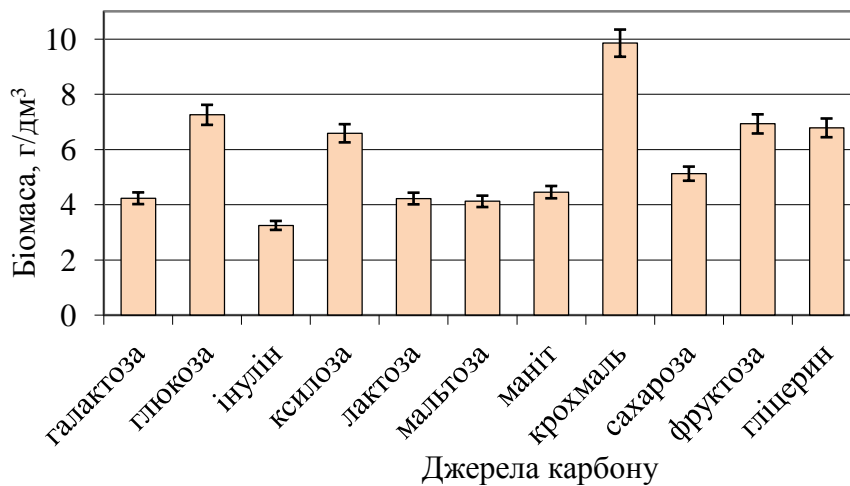


Рис. 3. Накопичення біомаси міцелію штамом *Laetiporus sulphureus* 1772 на середовищах з різними джерелами карбону в умовах глибинного культивування за температури 28 °С на 7-му добу культивування.

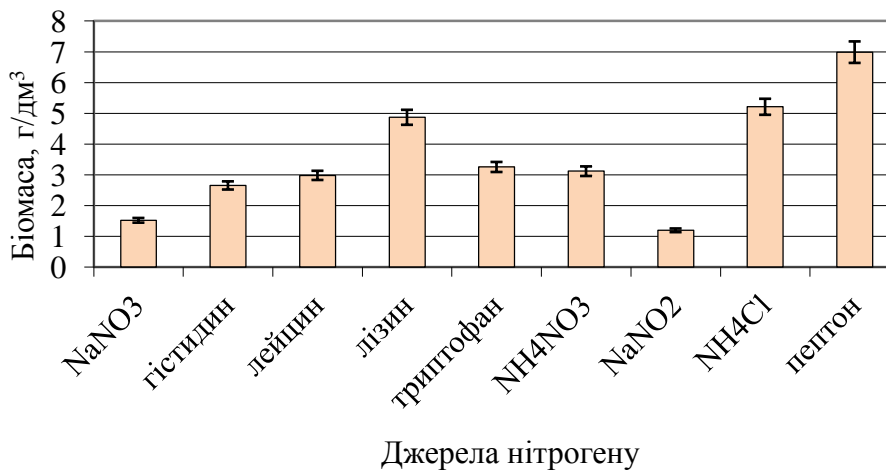


Рис. 4. Накопичення біомаси міцелію штамом *Laetiporus sulphureus* 1772 на середовищах з різними джерелами нітрогену в умовах глибинного культивування за температури 28 °С на 7-му добу культивування.

Найбільш сприятливим джерелом карбону для штаму *C. squamosus* 1826 виявилася фруктоза, при рості на якій концентрація накопиченої біомаси склала 0,23 г/дм³, що в 4 рази перевищує цей показник при культивуванні на середовищі з глюкозою (рис. 5). Серед дисахаридів найбільш сприятливим джерелом для росту *C. squamosus* виявилася лактоза (0,14 г/дм³), що в незначній мірі перевищило цей показник для сахарози, мальтози та ксилози. Серед спиртів найбільш ефективним джерелом карбону виявився гліцерин, на середовищі з яким накопичення біомаси штамом *C. squamosus* 1826 склало 0,12 г/дм³, в незначній мірі йому поступився дульцит (0,10 г/дм³).

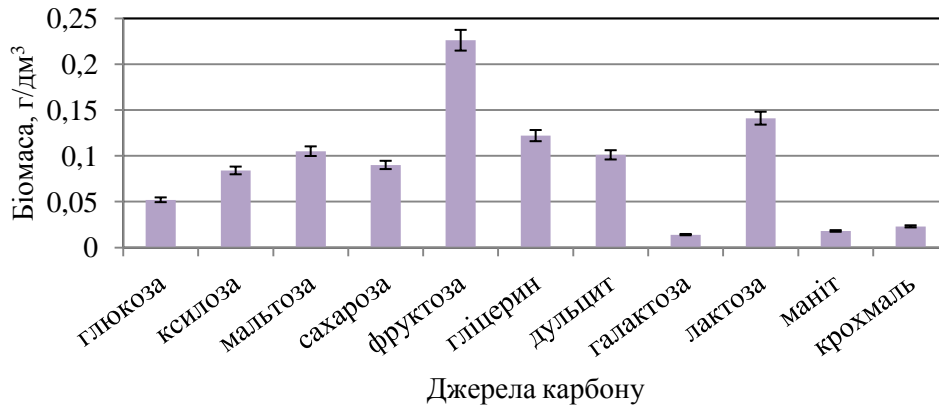


Рис. 5. Накопичення біомаси міцелію штамом *Cerioporos squamosus* 1826 на середовищах з різними джерелами карбону в умовах глибинного культивування за температури 28 °С на 7-му добу культивування.

Серед досліджених джерел нітрогену штам *C. squamosus* 1826 накопичував найбільшу біомасу на середовищі з пептоном (0,34 г/дм³), що у 8–10 разів перевищує цей показник як для органічних джерел нітрогену, а саме амінокислот, так і для неорганічних – солей амонію, нітратів та нітритів (рис. 6) Найбільш несприятливими джерелами нітрогену виявилися нітрит натрію (0,004 г/дм³) та аланін (0,02 г/дм³).

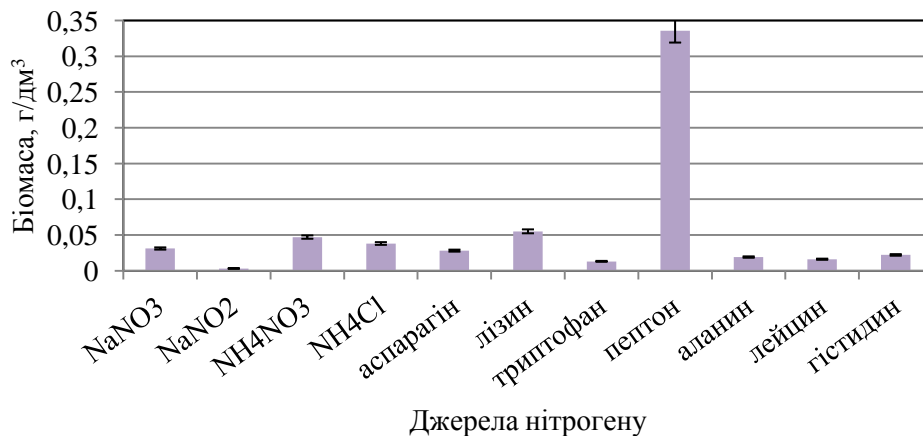


Рис. 6. Накопичення біомаси міцелію штамом *Cerioporos squamosus* 1826 на середовищах з різними джерелами нітрогену в умовах глибинного культивування за температури 28 °С на 7-му добу культивування.

Концентрація водневих іонів є одним з важливих факторів, що регулюють ріст дереворуйнівних базидіоміцетів в чистій культурі (The activity of certain..., 2007). Дослідження впливу вихідних значень рН здійснювали на середовищі СС на основі фосфатного буферу в діапазоні рН від 4,6 до 7,5 за температури 28°С.

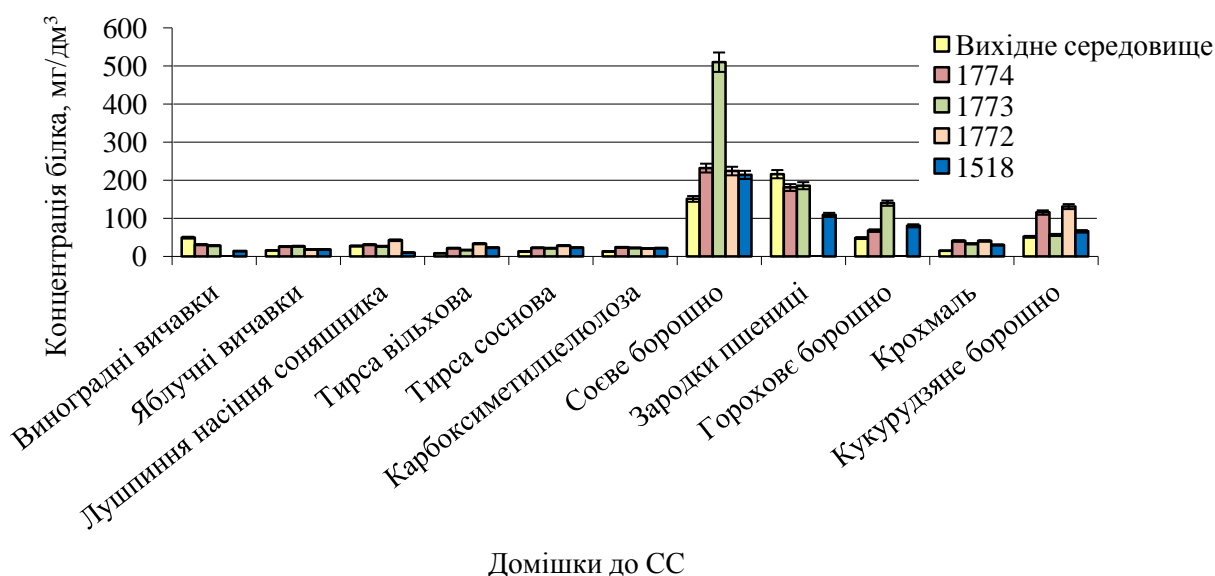
Найбільшу концентрацію біомаси штам *L. sulphureus* 1518 накопичував за вихідного рН 6,6 ($3,8 \pm 0,2$ г/дм³), при відхиленні від цього значення в лужний або у кислий бік спостерігалось різке зменшення цього показника більше ніж у 2 рази. Для досліджуваного штаму *S. squamosus* 1826 найбільш сприятливим початковим значення рН середовища є 6,9, за якого накопичення біомаси склало 0,52 г/дм³, що вдвічі перевищує цей показник для інших значень рН. При відхиленні в бік кислих значень спостерігається зниження рівня накопиченої біомаси до 0,27 г/дм³, а при відхиленні в бік лужних значень – до 0,30 г/дм³.

Було досліджено ріст 4 штамів *L. sulphureus* на живильних середовищах з різними домішками, що є залишками від переробки продуктів сільського господарства та неутілізованими відходами деревообробної та паперової промисловості. Показано позитивний вплив соєвого, горохового та кукурудзяного борошна, крохмалю та вільхової тирси на ріст міцеліальної біомаси.

Найліпших показників за накопиченням біомаси штами *L. sulphureus* 1518, 1772, 1773, 1774 досягали на живильних середовищах з соєвим (9,23 – 10,52 г/дм³), гороховим (7,33 – 7,54 г/дм³), кукурудзяним борошном (6,12 – 6,48 г/дм³), крохмалем (6,71 – 7,76 г/дм³) та тирсою вільховою (5,84 – 6,12 г/дм³). Найнижчі рівні накопичення біомаси спостерігався у всіх штамів на середовищі з карбоксиметилцелюлозою. Такі результати пов'язані з тим, що соєве, горохове та кукурудзяне борошно можуть виступати додатковими джерелами нітрогену, якого в інших домішках значно менше. Це підтверджується значним вмістом білка в культуральній рідині різних штамів *L. sulphureus* саме на живильних середовищах з соєвим (214 – 510 мг/дм³), гороховим (67,75 – 139,8 мг/дм³) і кукурудзяним борошном (56,4 – 130,8 мг/дм³) у порівнянні з іншими дослідженими середовищами і вихідними живильним середовищем (рис. 7).

У процесі росту всіх досліджених штамів *L. sulphureus* на середовищах з усіма домішками виявлено значне зниження рН середовища (з 6,6 до 2,2 – 2,3), яке відбувалося незалежно від використаних домішок. Одночасно зі зниженням рН відмічене зростання вмісту органічних кислот (з 9,5 до 99,5 мг-екв/ дм³), що свідчить про кореляцію цих показників між собою. Концентрація сухих і редуруючих речовин у середовищах з рослинними домішками зменшувалась для всіх штамів *L. sulphureus*, що є свідченням споживання цих речовин.

Важливими характеристиками для паспортизації штамів є відомості динаміки ростових показників. Для штаму *L. sulphureus* 1518 було досліджено зміну вмісту біомаси, рН, концентрації сухих речовин та білка на синтетичному середовищі з соєвим борошном (ССС) і на глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) впродовж 14 діб. За весь час культивування спостерігалось поступове накопичення біомаси до рівня 9,45 г/дм³ на середовищі ССС і 5,62 г/дм³ – на середовищі ГПС, цей процес супроводжувався зниженням рН з 6,6 до 2, зменшенням концентрації сухих речовин і білка.



Домішки до СС

Рис. 7. Накопичення білка в культуральній рідині штамми *Laetiporus sulphureus* в умовах глибинного культивування на синтетичному середовищі з різними рослинними домішками за температури 28°C на 7-му добу культивування.

РОЗДІЛ 5 БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *LAETIPORUS SULPHUREUS*

Дослідження антимікробної активності міцелію і культуральної рідини штамів *L. sulphureus* 306 – 308, 1518, 1772 – 1776 проводили на тест-культурах: *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 і грибів *Candida albicans* 259 ATCC 885-653, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor circinelloides* та *Cochiobolus* sp. Було показано виражені антимікробні властивості міцелію і культуральної рідини по відношенню до *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*. Антифунгальна активність у досліджених штамів була відсутня. Для подальшого отримання та виділення антимікробних речовин перспективним є культивування штамів *L. sulphureus* 307, 308 та 1518 протягом 10 – 14 діб, які мають найбільш широкий спектр антагонізму по відношенню до тест-культур.

Проведене визначення гемаглютинуючої активності міцелію і культуральної рідини штамів *L. sulphureus* 308, 1518, 1773, 1773, 1774, 1776. Встановлено, що рівень лектинів у екстракті з міцелію знаходився в межах від $1,5 \text{ (мг/см}^3\text{)}^{-1}$ до $3 \text{ (мг/см}^3\text{)}^{-1}$, а у культуральній рідині – від $0,3 \text{ (мг/см}^3\text{)}^{-1}$ до $2 \text{ (мг/см}^3\text{)}^{-1}$, що корелює з літературними відомостями для інших видів і дає підґрунтя для можливості отримання лектинів з міцелію *L. sulphureus* (Evaluation of Higher Basidiomycetes..., 2008).

Встановлено вміст каротиноїдів у міцелії *L. sulphureus* штаму 1518, який на середовищі ГПС склав $777,25 \pm 37,24$ мкг/г, на середовищі ССС - $289,19 \pm 14,64$ мкг/г.

Активність целюлолітичних ферментів штамів *L. sulphureus* при культивуванні протягом 7 діб на середовищі СС з глюкозою та карбоксиметилцелюлозою становила 60,18 та 59,08 Од/г білка відповідно; ця активність була достатньо низкою у порівнянні з комерційними препаратами ферментів для фінішної обробки бавовняних тканин (700–1000 Од/г), такими як Denimax G[®] 361 S та 601 S, Cellusoft G[®]-L та APL. Проте подальші дослідження надали можливість встановити найбільш ефективні умови обробки матеріалів на бавовняній основі ферментним комплексом штама *L. sulphureus* 1774 за рН 5 і температури 40°C. За цих умов зміна основних фізико-механічних властивостей тканини (втрата ваги зразка (Δw), еластичності волокон тканин (E), міцності на злам (F) і білизна ($W_{D65/10}$)) оброблених ферментним комплексом штаму *L. sulphureus* 1774 не поступалася показникам комерційних ферментних препаратів (табл. 1)

Таблиця 1

Зміна фізико-механічних властивостей різних текстильних матеріалів на бавовняній основі після обробки протягом 60 хвилин целюлазними комплексами

Текстильний матеріал	Параметр	Без обробки	Дистильована вода	Вихідне поживне середовище	Умови обробки тканин					
					Den361 S	Den601 S	Cell-L	Cell-APL	Культуральна рідина <i>L. sulphureus</i>	
					pH 7, TC	pH 7, EG	pH 5, TC	pH 5, EG	pH 5	pH 5,8
CvF/Co/Ly	Δw (%)	-	-0,12	-1,11	-	-	-	-	+1,03	-
	E (%)	19,08	-	33,93	-	-	-	-	34,53	-
	F (N)	719,14	-	779,30	-	-	-	-	729,06	-
	$W_{D65/10}$	32,2	34,5	23,60	-	-	-	-	25,9	24,0
CoA	Δw (%)	-	-3,64	-5,05	-0,89	-1,73	-3,91	-3,15	-3,27	-
	E (%)	13,59	-	20,17	17,75	19,93	16,16	17,93	22,74	23,98
	F (N)	813,96	-	788,08	712,79	808,12	744,14	751,95	767,58	838,48
	$W_{D65/10}$	3,6	9,6	12,8	15,1	14,3	14,0	14,1	15,5	19,9
CoB	Δw (%)	-	-3,90	-4,53	-2,05	-4,96	-3,95	3,14	-3,70	-
	E (%)	10,55	-	16,87	14,47	15,13	13,42	14,62	18,48	17,48
	F (N)	827,63	-	724,26	687,92	739,45	800,29	775,39	806,64	711,91
	$W_{D65/10}$	3,4	14,3	15,7	15,0	13,4	13,5	13,9	17,1	24,3

Примітка:

CvF/Co/Ly – змішана тканина віскозне волокно/бавовна/лайкра, щільність 233 г/см³;

CoA – бавовняна тканина, щільність 275 г/см³;

CoB – бавовняна тканина, щільність 222 г/см³.

Ефективність фінішної обробки бавовняних тканин ферментними комплексами штаму *L. sulphureus* 1774 було також підтверджено відсутністю на поверхні оброблених волокон пуху, мікрофібрил та інших нерівностей без порушення структури самого волокна, що встановили за допомогою сканувальної електронної мікроскопії.

ВИСНОВКИ

Отримані результати дають підстави сформулювати відповідні висновки:

1. Дослідження росту вегетативного міцелію видів лікарських базидієвих грибів *Laetiporus sulphureus* (17 штамів) і *Cerionorus squamosus* (9 штамів) у поверхневій та глибинній культурі, визначення культурально-морфологічних та фізіологічних властивостей дозволило отримати нові відомості про біологію цих видів і створити базу даних для подальшого розвитку нових грибних біотехнологій в Україні.
2. Виділено 13 штамів *Laetiporus sulphureus* і 7 штамів *Cerionorus squamosus* в чисту культуру, які поповнили Колекцію культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України. Описані їхніх морфологічні та фізіологічні ознаки на різних середовищах за різних умов культивування. З використанням світлової й сканувальної електронної мікроскопії здійснено верифікацію нових штамів і виявлення особливостей мікроструктури міцелію *Laetiporus sulphureus* та *Cerionorus squamosus*. Для *Laetiporus sulphureus* встановлені апікальні конідії, хламідоспори, анастомози й тонкі комунікативні гіфи, для *Cerionorus squamosus* – чисельні пряжки, ланцюжки артроконідій та дендроподібні структури.
3. На швидкості радіального росту *Laetiporus sulphureus* та *Cerionorus squamosus* впливають біологічні особливості штама, склад агаризованих живильних середовищ і температура культивування. Швидкості радіального росту штамів *Laetiporus sulphureus* та *Cerionorus squamosus* була вищою на сусло-агарі за температури 28°C. За цих умов більшість досліджених штамів *Laetiporus sulphureus* належить до групи з середньою швидкістю росту ($5 \text{ мм/добу} \leq V_r \leq 10 \text{ мм/добу}$) та виділяється група штамів з високою швидкістю росту ($10 \text{ мм/добу} < V_r$), штами *Cerionorus squamosus* – до групи з низькою швидкістю росту ($V_r < 5 \text{ мм/добу}$). Верхня гранична температура досліджених штамів *Laetiporus sulphureus* – 38°C, а для штамів *Cerionorus squamosus* – 36°C.
4. Отримана інформація щодо комплексу ферментів на агаризованих живильних середовища штамів *Laetiporus sulphureus* та *Cerionorus squamosus* з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України. Для досліджених штамів *Cerionorus squamosus* виявлено наявність всіх оксидаз, а для штамів *Laetiporus sulphureus* – тирозинази та пероксидази. Отримано відомості про наявність основних груп ферментів вуглецевого обміну (амілаза,

целюлаза, ксиланаза), азотного (протеаза, казеїназа, уреазы) та ліпідного (ліпаза) метаболізмів для досліджених штамів *Laetiporus sulphureus* та *Cerionporus squamosus*.

5. Встановлено сприятливі джерела карбону й нітрогену і початкове значення рН живильного середовища для культивування штамів *Laetiporus sulphureus* та *Cerionporus squamosus*. Джерелами карбону, які сприяли максимальній біомаси, була глюкоза для штамів *Laetiporus sulphureus* і фруктоза для штаму *Cerionporus squamosus*. Сприятливішим джерелом нітрогену для отримання біомаси обох видів виявився пептон. Найбільшому накопиченню біомаси штамів *Laetiporus sulphureus* сприяло початкове за значення рН живильного середовища 6,59, штаму *Cerionporus squamosus* – рН 6,86.
6. Показана можливість використання відходів сільського і лісового господарства та переробної промисловості як компонентів комплексних живильних середовищ для штамів *Laetiporus sulphureus* та показано позитивний вплив 1% соєвого, горохового та кукурудзяного борошна, крохмалю та вільхової тирси на накопичення біомаси. У процесі росту *Laetiporus sulphureus* виявлено значне зниження рН середовища (з 6,5-7 до 2,2-2,3), яке відбувалося незалежно від складу використаних середовищ та домішок.
7. Досліджено динаміку основних ростових характеристик гриба *Laetiporus sulphureus* штаму 1518 у глибинній культурі. За час культивування гриб використовує для накопичення біомаси живильні компоненти середовищ, про що свідчить зниження у 4,5 рази концентрації сухих речовин та білка за час культивування.
8. Показано, що штами *Laetiporus sulphureus* мають виражені антимікробні властивості, по відношенню до *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Для подальшого отримання та виділення антимікробних речовин перспективним є культивування штамів *Laetiporus sulphureus* 307, 308 та 1518, які мають найбільш широкий спектр антагонізму по відношенню до тест-культур, протягом 10 – 14 діб, що відповідає фазі сповільнення швидкості росту та початку стаціонарної фази росту культури.
9. Досліджено лектини та каротиноїди для штамів *L. sulphureus*. Визначено присутність лектинів як в міцелії, так і культуральній рідині *L. sulphureus* в межах від $0,3 \text{ (мг/см}^3\text{)}^{-1}$ до $3 \text{ (мг/см}^3\text{)}^{-1}$, що дає підґрунтя для можливості отримання лектинів не лише з базидіюм, а й з культури міцелія. Встановлено, що рівень лектинів вищий в міцелії, ніж в культуральній рідині. Показана перспективність дослідженого штаму *L. sulphureus* 1518 як потенційного продуцента каротиноїдів, вміст яких в міцелії, вирощеному на глюкозо-пептонному середовищі, склав $777,24 \pm 37,24$ мкг/г, що є достатнім початковим рівнем для подальшого підбору умов культивування.

10. Активність целюлолітичного ферментного комплексу штаму *Laetiporus sulphureus* 1774 при культивуванні протягом 7 діб на середовищах СС з глюкозою та карбоксиметилцелюлозою становила 60,18 та 59,08 Од/г білка відповідно. Застосування культуральної рідини *Laetiporus sulphureus* штаму 1774 для проведення фінішних процесів обробки тканин є перспективним, оскільки показники втрати ваги зразка, міцності на злам і еластичності волокон та білизни тканини після обробки не поступаються таким для комерційних ферментних препаратів. Сприятливі умови для здійснення фінішних процесів обробки бавовняних тканин рН на рівні 5 за температури 40°C.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз даних:

1. Дзыгун Л. П., Дудка И. А. Влияние твёрдых добавок на рост *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Basidiomycota) в глубинной культуре. *Микология и фитопатология*. 2008. Том 42, № 3. С. 232–239. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, здійснення статистичної обробки результатів, опрацювання та аналіз літературних матеріалів, написання частини тексту роботи).
2. Скрининг новых продуцентов целлюлолитических ферментных комплексов для процессов производства ткани / Тодосийчук Т. С., Кокол В., Дзыгун Л. П., Линовицкая В. М. *Биотехнология*. 2011. №6. С. 38–46. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень та здійснення статистичної обробки результатів стосовно виду *L. sulphureus*, опрацювання літературних матеріалів, написання частини тексту роботи).

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Дзыгун Л. П. Особливості дереворуйнівного базидіоміцета *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill в культурі. *Український ботанічний журнал*. 2004. Том 61, № 1. С. 100–105.
2. Дзыгун Л. П. Культуральні особливості дереворуйнівного гриба *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (BASIDIOMYCOTA). *Український ботанічний журнал*. 2005. Том 62, № 1. С. 91–99.
3. Дзыгун Л. П. Культивування дереворуйнівного гриба *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Basidiomycota) на рідких комплексних середовищах. *Український ботанічний журнал*. 2008. Том 65, № 1. С. 113–121.
4. Дзыгун Л. П. Лікарський ксилотрофний базидіоміцет *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill – перспективний об'єкт біотехнології. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2011. № 3. С. 40–49.
5. Бухало А. С., Дзыгун Л. П., Ліновицька В. М. Виділення вищих базидіоміцетів, перспективних продуцентів біологічно активних речовин в чисту культуру та їх довготривале зберігання. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2013. № 3. С.12–17. (Особистий внесок дисертанта: проведення

експериментальних досліджень стосовно виду *L. sulphureus* та *S. squamosus*, опрацювання літературних матеріалів, написання частини тексту роботи).

6. Дзигун Л. П., Палюшок О. А., Чуднівєць О. М. Підбір методів екстракції каротиноїдів із глибинного міцелію *Laetiporus sulphureus*. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2016. № 3. С.30–35. DOI: <https://doi.org/10.20535/1810-0546.2016.3.60515>. (Особистий внесок дисертанта: планування експериментальних досліджень, опрацювання та аналіз літературних матеріалів, написання частини тексту та формулювання теоретичних висновків роботи).
7. Сироїд О. О., Дзигун Л. П. Гранична межа критичної температури для базидієвого гриба *Laetiporus sulphureus*. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 3. С. 77–81. DOI: <https://doi.org/10.20535/1810-0546.2017.3.94962>. (Особистий внесок дисертанта: планування експериментальних досліджень, опрацювання та аналіз літературних матеріалів, написання частини тексту та формулювання теоретичних висновків роботи).
8. Дзигун Л. П., Ліновицька В. М. Отримання міцеліальної біомаси лікувальних грибів *Grifola frondosa* і *Laetiporus sulphureus* на синтетичних середовищах. *Innov Biosyst Bioeng*. 2019. Vol. 3, №. 4. С. 239–245. DOI: 10.20535/ibb.2019.3.4.186329. URL: <http://ibb.kpi.ua/article/view/186329> (дата звернення: 13.07.2020). (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, опрацювання літературних матеріалів та написання частини тексту роботи стосовно виду *L. sulphureus*).

Статті у інших наукових виданнях:

1. Дзигун Л. П., Кудрінецька А. В., Дуган О. М. Антимікробні властивості ксилотрофного базидіоміцету *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. 2011. № 700. С. 156–160. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень та здійснення статистичної обробки результатів, опрацювання та аналіз літературних матеріалів, написання частини тексту).
2. Дзигун Л. П., Дуган О. М. Вплив умов культивування на ріст ксилотрофних базидіоміцетів *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. та *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2012. Том 65, №1. С.178–185. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень та здійснення статистичної обробки результатів, опрацювання та аналіз літературних матеріалів, написання частини тексту).

Тези доповідей та матеріали конференцій:

1. Дзигун Л. П. Вивчення росту базидіальних макроміцетів на щільних середовищах. *Міжнародна наукова конференція молодих вчених, аспірантів і студентів “Сучасні методи створення нових технологій та обладнання в харчовій промисловості”*. Програма і матеріали конференції. Частина II. 23–25 квітня 2002 р. Київ : НУХТ, 2002. С. 65.

2. Дзигун Л. П. Дослідження швидкості росту вищого базидіального гриба *Laetiporus sulphureus* на щільних середовищах. *Международная конференция “Методологические основы познания биологических особенностей грибов продуцентов физиологически-активных веществ и пищевых продуктов”*. Программа и материалы конференции. 25–26 ноября 2002 г. Донецк : ДНУ, 2002. С. 98–102.
3. Дзигун Л. П., Якименко С. П. Дослідження штамів *Laetiporus sulphureus* на агаризованих середовищах. *I Всеукраїнська науково практична конференція студентів, аспірантів та молодих учених “Біотехнологія. Освіта. Наука.”* Тези доповіді учасників. 10–11 лютого 2003р. Київ : “Політехніка”, 2003. С. 44.
4. Dzygun L. P., Klechak I. R. Investigation Of some peculiarities of mushroom *Laetiporus sulphureus* in pure culture. XIV CEM Abstracts. XVI Congress of European Mycologists. Katsiveli, Yalta, Crimea, Ukraine. 22–27 September 2003. P. 103–104.
5. Kokol V., Todosiychuk T., Dzygun L., Linovytska V.M. Screening of New Microbial Producers of Enzymes for their Use in Textile Finishing Processes. *3rd International Conference on Textile Biotechnology INTB'04*, Graz, University of technology, Austria, June 13–14 2004. Book of abstracts. Technische Universitat : TUG. P. 37.
6. Дзигун Л. П., Дудка І. О. Антимікробні властивості афілофорального гриба *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill. *X з'їзд Товариства мікробіологів України*. Тези доповідей. 15–17 вересня 2004 р. Одеса : “Астропринт”, 2004. С. 208.
7. Линовицкая В. М., Дзыгун Л. П., Клечак И. Р., Бухало А. С. Высшие базидиальные грибы *Schizophyllum commune* и *Laetiporus sulphureus* как объект современной биотехнологии. *IV Всероссийского конгресса по медицинской микологии*. Успехи медицинской микологии. Т. 7. Материалы IV Всероссийского конгресса по медицинской микологии. М. : Национальная академия микологии, 2006. С.246–249.
8. Дзыгун Л. П., Клечак И. Р. Исследование ферментов у дереворазрушающих грибов на плотных питательных средах. *Материалы X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах»* 18–19 мая 2006 г. Санкт-Петербург : Изд-во Политехнического университета, 2006. С. 378.
9. Дзыгун Л. П., Клечак И. Р., Антоненко Л. А. Особенности культивирования гриба *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill. на жидких питательных средах различного состава. *Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы Международной научной конференции*. 1–2 июня 2006 г. Минск-Раков, 2006. С. 300–302.
10. Клечак И. Р., Дзигун Л. П., Ліновицька В. М., Антоненко Л. О. Антимікробні властивості деяких представників вищих базидіальних грибів. *Мікробні біотехнології* : тези доповідей. Міжнародної наукової конференції 11–15 вересня 2006 р. Одеса : Астропринт, 2006 с.131.

11. Dzygun L., Linovytska V., Klechak I. Cellulolytic Activities of Hight Basidiomycetes *Laetiporus sulphureus* and *Schizophyllum commune* in Submerged Cultures. *Розмаїття живого. Екологія. Адаптація. Еволюція.* : матеріали III Міжнародної конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня народження видатного українського ліхенолога М.Ф. Макаревич, 15–18 травня 2007 р. Одеса : Печатний дом, 2007. С. 85.
12. Антоненко Л. О., Дзыгун Л. П., Клечак И. Р., Линовицкая В. М. Особенности роста дереворазрушающих базидиомицетов на агаризованных средах. *Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества* : материалы юбилейной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М. В. Горленко, 4–6 февраля 2008 г. М. : ООО Изд-во «Восток – Запад», 2008. С. 38–52.
13. Клечак И. Р., Дзыгун Л. П., Линовицкая В. М., Антоненко Л. О. Окислительные ферменты базидиомицетов (*Coriolus sp.*, *Grifola frondosa*, *Laetiporus sulphureus*, *Polyporus squamosus*, *Schizophyllum commune*). *Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии* : материалы VI Международной научной конференции 2–6 июня 2008 г. В 2 т. Минск, 2008. Т. 1. С. 253–255.
14. Линовицька В. М., Дзыгун Л. П., Клечак И. Р. Дослідження ферментного комплексу вищих базидіальних дереворуйнівних грибів. *Шевченківська весна* : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції студентів, спірантів та молодих вчених, присвяченої 90-річчю з дня засування Українського Студентського Наукового Товариства Київського Університету Святого Володимира, 23 березня 2008 р. Вип. VI: У 4-х част. / за ред. проф. О.К.Закусила. К. : Обрії, 2008. Ч. 2. С. 68–70.
15. Линовицкая В. М., Дзыгун Л. П., Клечак И. Р., Бухало А. С. Влияние различных источников азота и углерода на рост высших дереворазрушающих базидиальных грибов. *Современная микология в России* : материалы 2-го Съезда микологов России, 16–18 апреля 2008 г. М. : Национальная академия микологии, 2008. Том 2. С. 335.
16. Дзыгун Л. П., Глушаков Ю. В. Дослідження дереворуйнівного гриба *Polyporus squamosus* (Basidiomycota) в глибинній культурі. *Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика* : тези доповідей IV Міжнародної науково-практичної конференції, 11–13 листопада 2008 р. Дніпропетровськ, 2008. С. 17–18.
17. Клечак И. Р., Линовицкая В. М., Дзыгун Л. П., Малюк А. М. Ферментативная активность высших базидиальных грибов при культивировании на агаризованных средах. *Международный микологический форум* : труды международного микологического форума, 23 апреля 2009 г. Международный научно-практический рецензируемый журнал. Иммунология, аллергология, инфектология. 2009. Том 2, № 2. С. 182–183.
18. Антоненко Л. О., Дзыгун Л. П., Клечак И. Р., Линовицька В. М. Вплив джерел вуглецю на ріст вищих лігнотрофних базидіомицетів в глибинній культурі. *Біологія: від молекули до біосфери* : матеріали IV Міжнародної конференції

молодих науковців, 17–21 листопада 2009 р. Харків : ППВ «Нове слово», 2009. С. 180–181.

19. Дзигун Л. П., Глушаков Ю. В. Оптимізація поживного середовища для культивування базидіального гриба *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (Basidiomycota) в глибинній культурі. *Біотехнологія XXI століття* : тези доповідей учасників IV науково-практичної конференції викладачів, студентів та аспірантів, присвяченої «Дням науки ФБТ», 19–23 квітня 2010 р. Київ, 2010. С. 28.
20. Чуднівєць О. М., Палюшок О. А., Дзигун Л. П. Вплив складу поживного середовища на біосинтез каротиноїдів базидіоміцетом *Laetiporus sulphureus*. *Біотехнологія: звершення та надії* : збірка тез IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 21–22 травня 2015 р., Київ : ВЦ НУБіП України, 2015. С. 85.

АНОТАЦІЯ

Дзигун Л.П. Біологія базидієвих макроміцетів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill та *Cerioporus squamosus* (Huds.) Quéł. в культурі. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.21 «Мікологія» (03 - Біологія). - Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей біології штамів лікарських базидіоміцетів *L. sulphureus* і *C. squamosus* в культурі та з'ясуванню можливості їх використання як біотехнологічних об'єктів. Проведено виділення чистих культур штамів досліджених видів. На агаризованих середовищах здійснено дослідження та опис морфолого-культуральних і мікроморфологічних характеристик їхнього вегетативного міцелію та впливу складу живильного середовища й температури на ріст міцелію. Встановлено спектр гідролітичних і окислювальних ферментів на агаризованих середовищах для досліджуваних видів. При глибинному культивуванні штамів *L. sulphureus* і *C. squamosus* досліджено їхній ріст на середовищах з 11 різними джерелами карбону й 9 різними джерелами нітрогену, з різним вихідним значенням рН середовища і різними рослинними домішками. Встановлено динаміку основних аналітичних показників при вирощуванні міцелію *L. sulphureus* у глибинній культурі. Досліджена біологічна активність штамів *L. sulphureus*.

Ключові слова: *Fomitopsidaceae*, *Polyporaceae*, вегетативний міцелій, культурально-морфологічні ознаки, швидкість радіального росту, оксидази, гідролітичні ферменти, антимікробна активність, каротиноїди.

АНОТАЦИЯ

Дзыгун Л.П. Биология базидиальных макромицетов *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill и *Cerrioporus squamosus* (Huds.) Quéf. в культуре. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.21 «Микология» (03 - Биология). - Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, 2020.

Диссертационная работа посвящена изучению особенностей биологии штаммов лекарственных базидиомицетов *L. sulphureus* і *C. squamosus* в культуре и выяснению возможности их использования как биотехнологических объектов. Проведено выделение чистых культур штаммов исследованных видов. На агаризованных средах проведено исследование и описание морфолого-культуральных и микроморфологических характеристик их вегетативного мицелия, а так же влияние состава питательной среды и температуры на рост мицелия. Определен спектр гидролитических и окислительных ферментов на агаризованных средах для исследованных видов. В условиях глубинного культивирования исследован рост штаммов *L. sulphureus* і *C. squamosus* на средах с 11 разными источниками углерода и 9 разными источниками азота, с разным исходным значением рН среды и разными растительными добавками. Установлено динамику основных аналитических показателей при выращивании мицелия *L. sulphureus* в глубинной культуре. Исследована биологическая активность штаммов *L. sulphureus*.

Ключевые слова: *Fomitopsidaceae*, *Polyporaceae*, вегетативный мицелий, культурально-морфологические признаки, скорость радиального роста, оксидазы, гидролитические ферменты, антимикробная активность, каротиноиды.

SUMMARY

Dzyhun L.P. Biology of basidiomycete macromycetes *Laetiporus sulphureus* (Bull. : Fr.) Murrill and *Cerrioporus squamosus* (Huds.) Quéf. in culture. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Theses for fulfill of degree of philosophy doctor in biological sciences, the major 03.00.21 «Mikology» – M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to study of the biology of strains of medicinal basidiomycetes *L. sulphureus* and *C. squamosus* in culture and to find out the possibility of their use as biotechnological objects.

There were 13 strains of *L. sulphureus* and 7 strains of *C. squamosus* from fruiting bodies collected during the vegetative period of these species in 2001-2003, which supplemented the composition of The IBK Mushroom Culture Collection,

described their cultural characteristics. It was found that the substrate, timing and season of fruiting bodies collection, as well as the storage time of cultures of strains of *L. sulphureus* and *C. squamosus* in the collection does not affect the morphological and growth traits. The growth and morphology of the culture depend on the composition of the nutrient medium and to a lesser extent on the strain characteristics.

Features of the microstructure of the mycelium of *L. sulphureus* and *C. squamosus* were revealed using a light microscope and a scanning electron microscope. For *L. sulphureus* apical conidia, chlamydospores, anastomoses and thin communicative hyphae were found, for *C. squamosus* - numerous clamp, chains of arthroconidia and dendroid structures.

Information on the rate of radial growth of *L. sulphureus* and *C. squamosus* on agar nutrient media of different compositions was obtained. In the studied cultures of *L. sulphureus*, the radial velocity ranged from 5.2 mm/day to 10.4 mm/day. The rate of radial growth of the studied strains of *C. squamosus* was in the range of 0.5 – 3.8 mm/day. The rate of radial growth differed on media of different compositions, the highest values were observed on agar beer wort for most strains of *L. sulphureus* and *C. squamosus*.

Among the studied temperatures, the most favorable for both studied species of *L. sulphureus* and *C. squamosus* was the temperature of 28°C. There were 12% of *L. sulphureus* strains showed more than 10 mm/day and the growth rate for 89% of *C. squamosus* strains was determined in the intervals of 2 to 4 mm/day at this temperature.

It was found that for the studied strains of *L. sulphureus* the upper limit temperature is 38°C, and for strains of *C. squamosus* – 36°C

Information on the complex of hydrolytic and oxidative enzymes of *L. sulphureus* and *C. squamosus* strains from the The IBK Mushroom Culture Collection was obtained. For the studied strains of *C. squamosus* the presence of all oxidases was detected, and for strains of *L. sulphureus* tyrosinase and peroxidase. Information on the presence of the main groups of enzymes of carbon metabolism (amylase, cellulase, xylanase), nitrogen (protease, caseinase, urease) and lipid (lipase) metabolism for the studied strains of *L. sulphureus* and *C. squamosus* was obtained.

The results obtained on the influence 11 different carbon sources and 9 different nitrogen sources in a nutrient medium for the accumulation of biomass strains of *L. sulphureus* and *C. squamosus*. The most favorable source for the accumulation of biomass of *L. sulphureus* strains among the studied was glucose and a source of nitrogen – peptone. The most favorable source of carbon for biomass *C. squamosus* was fructose and nitrogen – peptone.

It was found that the most favorable for the accumulation of biomass initial pH value for *L. sulphureus* is 6.6, and for *C. squamosus* is 6.9.

The results obtained, among grape and apple pomace, sunflower seed husk, soybean, corn and pea flour, starch, wheat germ, alder and pine sawdust, as well as carboxymethylcellulose, which were used as impurities in the synthetic nutrient medium. wheat, pea and corn flour and starch are the most suitable for further use. It

was on media with soybean flour that the greatest accumulation of biomass of *L. sulphureus* strains was observed 9.34 – 10.52 g/dm³.

The dynamics of changes in biomass, pH, dry matter and protein on soy-synthetic and glucose-peptone nutrient media for the strain *L. sulphureus* 1518 under conditions of submerged cultivation. It is shown that the presence of soy flour in the nutrient medium accelerates the yield of the growth curve to the stationary growth phase.

L. sulphureus strains have pronounced antimicrobial properties against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. For further production and isolation of antimicrobial substances, it is promising to cultivate strains of *L. sulphureus* 307, 308 and 1518 for 10-14 days, which have the widest range of antagonism in relation to test cultures.

The presence of lectins in both the mycelium and the culture fluid of *L. sulphureus* in the range from 0.3 (mg/cm³)⁻¹ to 3 (mg/cm³)⁻¹, which provides a basis for the possibility of obtaining lectins not only from fruiting bodies, but and from mycelial culture.

The content of carotenoids is higher when growing the mycelium of the strain *L. sulphureus* 1518 on a medium with glucose and peptone (777,25 ± 38,37 µg/g), in contrast to the synthetic medium with soy flour (289,02 ± 14,64 µg/g), however, this shows the viability of the studied strain of *L. sulphureus* as a producer of carotenoids.

The established activity of cellulolytic enzymes of the strain *L. sulphureus* 1774 when cultured for 7 days on medium with glucose and carboxymethylcellulose was 60.18 and 59.08 U/g protein, respectively.

The prospects of using the culture fluid of *L. sulphureus* strain 1774 for finishing processes of tissue treatment are promising, because the main indicators it is not inferior to commercial enzyme preparations. The most favorable conditions for the implementation of finishing processes of cotton fabrics, namely the pH at the level of 5 and at a temperature of 40°C.

Key words: *Fomitopsidaceae*, *Polyporaceae*, vegetative mycelium, cultural and morphological features, growth rate, oxidative enzymes, hydrolytic enzymes, antimicrobial activity, carotenoids.