

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

ЛІНОВИЦЬКА ВІТА МИХАЙЛІВНА



УДК 582.284+579.222

**БІОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКИХ БАЗИДІЄВИХ МАКРОМІЦЕТІВ
SCHIZOPHYLLUM COMMUNE FR. ТА *GRIFOLA FRONDOSA* (DICKS.)
GRAY В УМОВАХ КУЛЬТУРИ**

03.00.21- мікологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
БІСЬКО Ніна Анатоліївна,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
провідний науковий співробітник відділу мікології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник, доцент
ФЕДОТОВ Олег Валерійович,
Донецький національний медичний університет
МОЗ України
завідувач кафедри медичної біології

кандидат біологічних наук, доцент
КУЗНЕЦОВА Ольга Віталіївна,
Державний вищий навчальний заклад «Український
державний хіміко-технологічний університет»
доцент кафедри біотехнології

Захист відбудеться “30” листопада 2020 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.211.01 Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за адресою: 01024, Київ, вул. Терещенківська, 2

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

Автореферат розісланий “ ____ ” жовтня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



С.О.Нипорко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Базидієві гриби використовуються людиною з давніх часів, як безпосередньо для харчування, так і у народній медицині. Але їх хімічний склад та біосинтетичні властивості зумовлюють подальші поглиблені наукові дослідження з метою збільшення можливих напрямків їх практичного застосування. Розширення галузі використання лігнотрофних базидіоміцетів значною мірою пов'язано з тим, що з цих грибів отримують різноманітні біологічно активні речовини та виробляють препарати на їх основі – ферменти, антибіотики, лікувально-профілактичні та косметичні препарати, нутрицевтики та інші різноманітні органічні сполуки (Биологические..., 2011, 2012; Бухало, 1996; Anti-Diabetic..., 2019; Lorenzen, 1998; Medicinal mushroom..., 2018; Mizuno, 1999; Stamets, 2000; Wasser, 2007; Zhuang, 1999, 2004). Так, на основі базидієвих грибів *Schizophyllum commune* Fr. та *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray у країнах Європи, Південно-Східної Азії та США створені унікальні протипухлинні препарати, у тому числі грифолан та шизофілан (Биологические..., 2011, 2012; Boh, 2007; Hobbs, 2005; Lorenzen, 1998; Medicinal mushroom..., 2018; Mizuno, 1999; Stamets, 2000; Wasser, 2007; Zhuang, 1999, 2004). Саме тому значна кількість публікацій присвячена насамперед результатам медико-біологічних досліджень β -глюканів шизофілану і грифолану (Anti-Diabetic..., 2019; Boh, 2007; Chen, 2019; Hobbs, 2005; Ji, 2019; Lorenzen, 1998; Wasser, 2007; Zhuang, 1999, 2004). Проте, культурально-морфологічні і фізіолого-біохімічні особливості цих грибів досліджено тільки на ряді штамів (Бухало, 1988, 1995, 1996; Ломберг, 2005; Соломко, 2005; Веровіч, 2008; Boh, 2007; Scaling..., 2007; Hobbs, 2005; Maziero, 1999; Stamets, 2000). Також наявні лише фрагментарні дані щодо біологічних характеристик штамів *S. commune* і *G. frondosa*, виділених у культуру з плодових тіл, зібраних на території України, що не дає змоги у повному обсязі використати практичний потенціал цих видів.

Крім того, у зв'язку з важливістю питання збереження біорізноманіття, особлива увага повинна приділятися саме виду *G. frondosa*, який внесено до Червоної Книги України як «вразливий» і який підлягає охороні на національному рівні (Червона Книга..., 2009).

Отже, вивчення біологічних особливостей цінних лікарських видів *S. commune* та *G. frondosa* у поверхневій і глибинній культурі з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України та її поповнення новими штамми *S. commune* є актуальним і доцільним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з індивідуальним планом роботи аспіранта відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України та на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» у рамках науково-дослідних тем: №М/246-2003 “Дослідження модифікованих ферментних систем для альтернативних текстильних фінішних процесів” і №ДП/325-2003 “Розробка

технології гідролітичного поліферментного препарату мікробного походження” та за підтримки гранту Фонду фундаментальних досліджень МОН України «Закономірності росту базидієвих грибів у глибинній та поверхневій культурі» № 25.5/086 Ф25/644-2007.

Мета і завдання. Мета роботи – дослідження біологічних особливостей штамів лікарських грибів *S. commune* та *G. frondosa* за різних умов культивування.

Для досягнення мети було визначено такі **завдання**:

1. Виділити чисті культури нових штамів *S. commune* з природного матеріалу, зібраного на території України.
2. Дослідити вплив складу агаризованих живильних середовищ і температури інкубації на культурально-морфологічні особливості і швидкість радіального росту штамів *S. commune* і *G. frondosa*.
3. Провести скринінг штамів *S. commune* і *G. frondosa* за активністю ферментів різних класів з метою визначення штамових особливостей, а також для оцінки перспектив використання обраних штамів як продуцентів ферментних препаратів.
4. Визначити вплив різних джерел карбону і нітрогену та їх співвідношення, а також кислотності та органічних домішок у рідких живильних середовищах на накопичення біомаси, біосинтез полісахаридів і активність ферментів штамів *S. commune* та *G. frondosa*.
5. За комплексом визначених ознак відібрати штами *S. commune* та *G. frondosa*, перспективні для біотехнологічного застосування, запропонувати умови їх культивування для отримання різних цільових продуктів та дослідити можливість практичного застосування біологічно активних речовин з *S. commune* (екзополісахаридні та ферментні комплекси).

Об'єкт дослідження — штами двох видів лікарських лігнотрофних базидієвих грибів *S. commune* і *G. frondosa*.

Предмет дослідження — зміни біологічних властивостей штамів *S. commune* і *G. frondosa* за різних умов культивування міцелію.

Методи дослідження. У роботі були використані мікологічні, фізіолого-біохімічні, мікробіологічні, молекулярно-біологічні, електронно-мікроскопічні і статистичні методи досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше досліджено ріст і морфологію колоній 21 штаму *S. commune* і 8 штамів *G. frondosa* з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України на 15 агаризованих живильних середовищах різноманітного складу за різних умов культивування. В результаті встановлено переважний вплив на морфологію колоній складу агаризованих живильних середовищ. Показано, що найбільша максимальна швидкість радіального росту штамів обох видів спостерігалася на сусло-агаровому середовищі, що дозволило віднести *G. frondosa* до культур з середньою швидкістю росту, а *S. commune* до швидкоростучих видів базидієвих макроміцетів. Для досліджених культур визначено найсприятливіші за складом живильні агаризовані середовища,

діапазон температур, які забезпечують збереження життєдіяльності вегетативного міцелію, для ряду штамів визначені оптимальні для росту міцелію температури. Вперше було визначено максимальні, критичні для життєдіяльності міцелію, значення температур — 35-36 °С для штамів *G. frondosa*, і 57-58 °С для штамів *S. commune*.

На агаризованих живильних середовищах також було проведено дослідження активності ферментів різних класів і встановлено видові та штамові особливості її прояву.

Проведено дослідження накопичення біомаси, синтезу екзополісахаридів штамми *S. commune* та біомаси, ендо- та екзополісахаридів штамми *G. frondosa* на рідких живильних середовищах у глибинній і поверхневій культурі. Для досліджених штамів *S. commune* та *G. frondosa* встановлено сприятливі для отримання біомаси та синтезу полісахаридів джерела карбону та нітрогену, їх співвідношення, а також кислотність живильного середовища.

Отримані нові для культур *G. frondosa* та *S. commune* відомості щодо впливу додавання органічних домішок (кукурудзяний екстракт, меляса, пептон, пивне сусло, екстракт кормових дріжджів) до рідкого синтетичного живильного середовища з глюкозою та нітратом амонію на накопичення біомаси, біосинтез екзополісахаридів, динаміку концентрації екзоклітинного білку і редукуючих речовин та активність целюлолітичних ферментів.

Запропоновано умови глибинного культивування відібраних штамів *S. commune* та *G. frondosa* (склад синтетичних рідких середовищ з глюкозою, нітратом амонію та органічними домішками, рН, температура, перемішування) для отримання міцеліальної біомаси та синтезу екзополісахаридів штамом *S. commune* 1760, а також синтезу ендо- та екзополісахаридів і міцеліальної біомаси штамом *G. frondosa* 1790.

Вперше встановлено особливості впливу комплексу екзоферментів, отриманих з культуральної рідини *S. commune* 5009, на характеристики бавовняних тканин.

Вперше виявлено стимулюючий вплив екзополісахаридів у низьких концентраціях, отриманих з культуральної рідини *S. commune* 1760, на культуру перещеплюваних клітин тестикул поросяти *in vitro*.

Практичне значення отриманих результатів. З плодівих тіл, зібраних на території України, виділено у чисту культуру 13 штамів *S. commune*, які були передані на зберігання до Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІВК). Визначено умови культивування, склад живильних середовищ і температуру інкубації, що забезпечують довготривале збереження цих культур у колекції.

Визначено мікроструктури вегетативного міцелію *S. commune* та *G. frondosa*, за якими можна контролювати таксономічну приналежність культур та їх чистоту при зберіганні у Колекціях та у біотехнологічних процесах.

Запропоновано умови культивування та зберігання вегетативного міцелію *S. commune* та *G. frondosa* на агаризованих живильних середовищах.

За комплексом досліджених ознак відібрано перспективні для біотехнологічного застосування штами *S. commune* 1760 та *G. frondosa* 1790 і визначені умови їх культивування для отримання різних цільових продуктів.

Вперше досліджено можливість практичного застосування біологічно активних речовин з *S. commune* (екзополісахаридні та ферментні комплекси) у текстильній промисловості та для культивування клітин тварин *in vitro*. Підтверджено видову приналежність обраного штаму продуценту із застосуванням молекулярно-біологічного методу визначення маркерної ДНК-послідовності гену малої рибосомальної субодиниці.

Результати роботи використано для розробки та постановки лабораторних робіт з дисциплін «Основи мікології», «Загальна біотехнологія» та «Біотехнологія сільськогосподарських виробництв», що підтверджено Актом впровадження виконаних досліджень у навчальний процес.

Особистий внесок здобувача. Робота виконана під керівництвом д.б.н, професора А.С. Бухало та д.б.н, професора Н.А. Бісько і є самостійним дослідженням здобувача. Особиста участь дисертанта полягала у обранні методичних підходів щодо поставлених завдань, виконанні основного обсягу експериментальних досліджень, критичному аналізі даних літератури, систематизації та аналізу отриманих результатів, статистичній обробці експериментального матеріалу.

Аналіз та узагальнення результатів, формулювання основних положень та їх висновків, частину експериментів з вивчення мікроструктур вегетативного міцелію методом сканувальної електронної мікроскопії, підготовку до друку наукових статей проведено спільно з науковими керівниками дисертаційної роботи д.б.н, професором А.С. Бухало та д.б.н, професором Н.А. Бісько.

Дослідження зміни параметрів бавовняних тканин після обробки ферментами целюлолітичного комплексу штаму *S. commune* були виконані на базі Institute of Engineering Materials and Design, University of Maribor, м.Марібор, Словенія, у співпраці з Assist.Prof.Dr. Kokol Vanja. Дисертантом було проведено культивування штаму *S. commune* 5009, отримано та виконано аналіз ферментного комплексу, виконано обробку бавовняних тканин ферментними препаратами, взято участь у аналізуванні впливу ферментного препарату на тканини.

Визначення впливу екзополісахаридного комплексу з *S. commune* на культуру перещеплених клітин тестикул поросяти *in vitro* було виконано у співпраці з к.б.н. Трохименко О.П., ст.н.співробітника Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика. Дисертантом було проведено культивування штаму *S. commune* 1760, виділено та очищено екзополісахаридний комплекс, взято участь у підготовці клітинних культур, обробці їх препаратом екзополісахаридів, а також аналізуванні впливу на перещеплену культуру тестикул поросяти *in vitro*.

Молекулярно-генетичні дослідження виконувалися на базі Huaiyin Normal University, Huai'an, Jiangsu Province, Китай. Отримання зразків міцелію виконане дисертантом самостійно. Виділення ДНК, ПЛР, секвенування та робота з базою даних здійснювалися к.б.н. Кіщенко О.В. за участю дисертанта.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення та результати роботи викладено та обговорено на засіданнях відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (Київ, 2002 – 2020 рр.) та засіданнях кафедри промислової біотехнології ФБТ КПІ імені Ігоря Сікорського. Результати дисертаційної роботи було представлено на конференціях: The 7-th International Mycological Congress (Oslo, 11-17 August, 2002); Міжнародна наукова конференція молодих вчених, аспірантів і студентів “Сучасні методи створення нових технологій та обладнання в харчовій промисловості” (м. Київ, 23-25 квітня 2002); II Международная конференция «Методологические основы познания биологических особенностей грибов – продуцентов физиологически активных соединений и пищевых продуктов» (г. Донецк, 25-27 ноября 2002); XIV Congress of European Mycologists (Katsiveli, Crimea, Ukraine, 22-27 September 2003); 3rd International Conference on Textile Biotechnology INTB'04 (Graz, Austria, June 13-14, 2004); X та XIII з'їзди Товариства мікробіологів України (м. Одеса, 2004 та м. Ялта, 2013); VI Національний з'їзд фармацевтів України (м. Харків, 28-30 вересня 2005); Четвертый Всероссийский Конгресс по Медицинской микологии (г. Москва, 29-31 март, 2005); X Всероссийская конференция по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах» (г. Санкт-Петербург, 18-19 мая 2006); Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 2006, 2009, 2010); Международная научная конференция «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (г. Минск-Раков, 1-2 июня 2006); Міжнародна наукова конференція «Мікробні біотехнології» (м. Одеса, 11-15 вересня 2006); III Международная конференция молодых ученых "Биоразнообразие. Экология. Эволюция. Адаптация" посвященная 100-летию со дня рождения выдающегося украинского лихенолога М.Ф. Макаревич (г. Одеса, 15-18 мая 2007); Юбилейная конференция «Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества», посвященная 100-летию со дня рождения М.В.Горленко (г. Москва, 22-25 февраля 2008); VI Международная научная конференция «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (г. Минск, 2-6 июня 2008); Міжнародна науково-практична конференція студентів, спірантів та молодих вчених «Шевченківська весна», присвячена 90-річчю з дня заснування Українського Студентського Наукового Товариства Київського Університету Святого Володимира (м. Київ, 20-23 березня 2008); II Съезд микологов России (г. Москва, 16-18 апреля 2008); 21st CODATA International Conference, Scientific Information for Society-from Today to the Future (Kyiv, 5-8 October, 2008); Міжнародна науково-практична конференція «Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика» (м. Дніпропетровськ, 11-13 листопада 2008); Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (м. Харків, 18-21 листопада 2008); Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія ХХІ століття» (м. Київ, 2011-2019); Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та перспективи розвитку науки на початку третього тисячоліття у країнах Європи та Азії» (м. Переяслав-Хмельницький, 2015, 2019); IV Всеукраїнська науково-

практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, 2015, 2016); IV Міжнародна конференція «Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих території: реалізація природоохоронних стратегій» (м. Київ, 16-20 травня 2016); VIII Міжнародна науково-технічна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Хімія та сучасні технології» (м. Дніпро, 26-28 квітня 2017); Міжнародна науково-практична конференція «Природоохоронні, історико-культурні та екоосвітні аспекти збалансованого розвитку Українських Карпат (м. Косів Івано-Франківської обл., 8-9 червня 2017); V Міжнародна конференція «Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження Глобальної стратегії збереження рослин» (м. Херсон, 25-28 червня 2018); V Всеукраїнська заочна науково-практична конференція «Національний науковий простір: перспективи, інновації, технології» (м. Харків, 13-14 квітня 2018); IX Міжнародна науково-технічна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Хімія та сучасні технології» (м. Дніпро, 24-26 квітня 2019); VII Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки» (м. Дніпро, 6-7 червня 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 15 робіт (14 у співавторстві), у тому числі 1 стаття в іноземному рецензованому виданні, що індексується Web of Science та Scopus (“International Journal of Medicinal Mushrooms”), 10 статей у фахових закордонних виданнях та фахових виданнях, рекомендованих Міністерством освіти і науки України (“Український ботанічний журнал”, “Наукові вісті НТУУ «КПІ»”, “Международный научно-практический рецензируемый журнал Иммунология, аллергология, инфектология”, “Advances in Biology & Earth Sciences”, “Innovative Biosystems and Bioengineering”, “Биотехнология”), 4 статі в інших виданнях і сорок дев'ять тез доповідей у збірниках наукових конференцій .

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 227 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 14 таблицями та 64 рисунками. Список використаних джерел містить 314 найменувань, з них 98 — кирилицею та 216 — латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* ТА *GRIFOLA FRONDOSA*, ДОСЛІДЖЕННЯ У КУЛЬТУРІ ТА ЇХ ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

У розділі, який є оглядом літератури і складається з трьох підрозділів, наведено систематичне положення, морфологічні особливості та географічне поширення *S. commune* та *G. frondosa*. На основі аналізу даних літератури розглянуто практичне значення цих видів грибів, а саме біологічно активні речовини, що ними синтезуються та харчова цінність їстівного виду *G. frondosa*. Також подано стан дослідженості обох видів в умовах чистої культури. З урахуванням аналізу літературних даних визначено актуальність власного дослідження.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були види лікарських ксилотрофних базидієвих грибів — *Schizophyllum commune* Fr. та *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім.М.Г.Холодного НАН України (ІВК). Загалом були досліджені 21 штам *S. commune*, 13 з яких виділено у чисту культуру дисертантом, і 8 штамів *G. frondosa*. Ізольовані штами передано до колекції ІВК і наведені у роботі під її номерами.

Особливості морфології вегетативного міцелію обох видів досліджували за допомогою оптичного мікроскопу МБИ-15 за загальноприйнятими методиками (Методы..., 1982). Мікроструктури чистих культур обох видів вивчали у сканувальному електронному мікроскопі (СЕМ) JSM-35С (Бухало, 1988).

Основні культурально-морфологічні ознаки і швидкість радіального росту (V_R) культур *S. commune* та *G. frondosa* досліджували на 15 агаризованих живильних середовищах різного складу: натуральних (в тому числі агаризованому пивному суслі (СА), картопляно-глюкозному агарі (КГА), глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі (ГПС) тощо) і синтетичних (в тому числі середовищі Норкранс (СН), середовищі Чапека (СЧ), синтетичному середовищі з глюкозою та нітратом амонію (СС) та інших).

Вплив температури на швидкість радіального росту й культурально-морфологічні ознаки обох видів вивчали за температур 4, 20, 28 та 37 ± 1 °С.

Для визначення максимальних критичних для росту міцелію штамів *S. commune* температур культури інкубували в діапазоні 38 – 58 °С, а штами *G. frondosa* –30 – 38 °С.

Активність гідролітичних ферментів – протеазну, казеїназну, уреазну, амілазну, целюлазну (глюкозидазну, КМЦ-активність), пектат-транселіміназну, полігалактуроназну, ліпазну та ксиланазну визначали за допомогою ферментативних тестів (кольорових реакцій) на агаризованих середовищах з використанням хімічних сполук для виявлення активності (Molitoris, 2000).

Дослідження росту грибів на рідких живильних середовищах виконували відповідно до описаної методології (Бухало, 1988; Соломко, 1992, 1994).

Сприятливі для культур значення рН, які встановлювали за накопиченням біомаси, а також рН, сприятливі для біосинтезу екзополісахаридів, визначали на рідких синтетичних середовищах з глюкозою та нітратом амонію, що готувалися на буферних калій-фосфатних розчинах з різним значенням рН – від 4,6 до 8,1 (Рабинович, 1977).

Для підбору найсприятливіших для накопичення біомаси та екзополісахаридів джерел карбону та нітрогену використовували синтетичне середовище з глюкозою та нітратом амонію (Бухало, 1988), до якого в якості єдиного джерела карбону замість глюкози в кількості еквівалентній 20 г/дм³ додавали ксилозу, фруктозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, інулін, крохмаль, гліцерин, маніт або, в якості джерела нітрогену, замість нітрату амонію в кількості еквівалентній 3 г/дм³ додавали гістидин, лейцин, лізин, триптофан, NaNO₃, NaNO₂, NH₄Cl або пептон.

Дослідження впливу різних співвідношень джерел карбону та нітрогену та їх оптимальну концентрацію для накопичення біомаси та екзополісахаридів визначали на синтетичному живильному середовищі з додаванням глюкози в концентрації від 4 до 50 г/дм³ в якості єдиного джерела карбону та додаванням нітрату амонію в якості єдиного джерела нітрогену в концентрації від 2 до 10 г/дм³ в різних співвідношеннях.

Для встановлення впливу на біосинтетичні властивості штамів *S. commune* та *G. frondosa* додаткових ростових факторів було здійснено глибинне культивування на синтетичному живильному середовищі з глюкозою і нітратом амонію (СС) з додаванням одного з наступних компонентів: пивне сусло, бурякова меляса, кукурудзяний екстракт (КЕ), пептон, екстракт кормових дріжджів (ЕКД).

Рівень накопичення біомаси в усіх дослідах визначали ваговим методом, висушуючи міцелій до постійної маси (а.с.м.) за температури 105 °С (Методы..., 1982).

Вміст редуруючих речовин у культуральній рідині визначали методом Хагедорна – Йенсена фотометрично (Скуратовская, 2005). Концентрацію білку визначали методом Лоурі (Кочетов, 1992).

Для визначення концентрації екзополісахаридів спочатку проводили кількісне виділення екзополісахаридного комплексу, в якому визначали концентрацію екзополісахаридів фенол-сірчаним методом (Варбанец, 2006).

Ендополісахариди виділяли з висушеного міцелію з наступним визначенням концентрації ендополісахаридів фенол-сірчаним методом (Варбанец, 2006).

Крім того, протягом культивування на комплексних живильних середовищах було визначено активність гідролітичних ферментів: ендо-1,4-β-глюканази (ЕС 3.2.1.4 ендо-1,4-β-D-глюканглюкогідролаза) (U, мкмоль/(год×см³)) за рівнем утворення глюкози в інкубованій суміші з 0,3% карбоксиметилцелюлози (КМЦ-активність) (Методы..., 1982) та екзо-β-глюканази (ЕС 3.2.1.91 екзоцелобіогідролаза, 1,4-β-D-глюканцелобіогідролаза) (U, мкмоль/(год×см³)) за рівнем гідролізу фільтрувального паперу (ФП-активність) (Методы..., 1982). В обох випадках кількість глюкози, що утворювалась в результаті дії ферментів, визначали фотометрично методом Хагедорна – Йенсена (Скуратовская, 2005).

Для дослідження можливості використання екзоферментного комплексу *S. commune* 5009 в текстильній промисловості було проведено глибинне культивування штаму на середовищі Норкранс з додаванням глюкози, пивного сусла та різних індукторів. В отриманому культуральному фільтраті було визначено ферментативні активності, виділено та сконцентровано екзоклітинні білки, проведено їх електрофоретичний аналіз і виконано обробку зразків бавовняних матеріалів. Оцінку результатів обробки бавовняних матеріалів проводили за рівнем деградації целюлози, вимірюючи кількість редуруючих речовин, які утворилися у реакційному середовищі, феріціанідним методом (Скуратовская, 2005), а також за змінами фізичних характеристик зразків

текстилю - ваги (Δm), міцності на розрив (F), подовження (E), білизни (W). Сканувальну електронну мікроскопію зразків тканини здійснювали на мікроскопі Camridge S 360.

Для визначення впливу екзополісахаридного комплексу штаму *S. commune* 1760 на культуру перещеплених клітин тестикул поросяти (ПТП) *in vitro* екзополісахариди осаджували етанолом, проводили депротейнізацію методом Севага (Гемицеллюлози, 1991) та стерилізували фільтруванням. Культуру ПТП отримували на ростовому середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) з 5% ембріональної сироватки телят (ЕТС) при 37°C впродовж 24 годин в атмосфері 5% CO₂. Наявність чи відсутність цитопатичної дії екзополісахаридного комплексу на культуру клітин ПТП оцінювали через 24, 48 та 72 години.

Для отримання достовірних результатів експериментальні дослідження залежно від умов аналізу та вимог математичного планування здійснювали у 3–5 повторах. Після визначення досліджуваних показників їх достовірні значення обчислювали статистичними методами аналізу і знаходили такі показники: значення середніх квадратичних відхилень, коефіцієнтів варіацій, довірчих інтервалів. У таблицях наведено середні статистично достовірні дані при 95%-й ймовірності. Достовірно відмінними визначалися параметри при $p \geq 0,05$, що визначали за допомогою критерію Стьюдента. Для статистичної обробки отриманих показників використовували комп'ютерні програми – прикладний пакет Microsoft Excel 2000 і Sigma Stat 2.0 (Доспехов, 1973; Молотов, 1965).

РОЗДІЛ 3 КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* ТА *GRIFOLA FRONDOSA* НА АГАРИЗОВАНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

3.1. Мікроморфологічна характеристика міцелію штамів *Schizophyllum commune* та *Grifola frondosa*. Дослідження мікроморфології культур *S. commune*, що були вирощені на агаризованих живильних середовищах і в глибинній культурі, показало наявність на вегетативному міцелії у всіх штамів характерних для цього виду мікроструктур: великої кількості пряжок, анастомозів, а також головчастих виростів (екскреторних елементів). Вперше усі вищезгадані мікроструктури штамів *S. commune* також було досліджено з використанням СЕМ (рис. 1). Мікроскопічні дослідження міцелію *G. frondosa* також показали наявність анастомоз та пряжок.

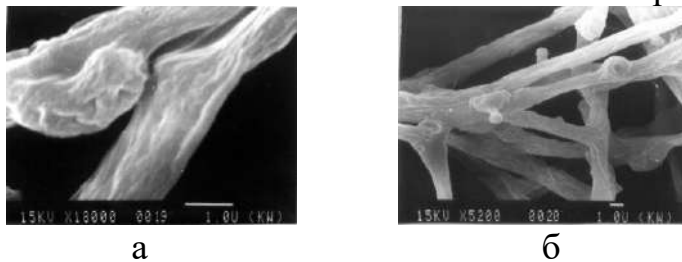


Рисунок 1. *Schizophyllum commune* 1761: а - пряжка (СЕМ, x18000); б - анастомози та екскреторні клітини (СЕМ, x5200).

3.2. Морфологічні особливості міцеліальних колоній штамів *Schizophyllum commune* та *Grifola frondosa* на агаризованих середовищах різного складу.

В результаті проведених досліджень штамів *S. commune* на 15 агаризованих живильних середовищах встановлено, що морфологія колоній залежить у першу чергу від складу агаризованих середовищ і має меншу мінливість у різних штамів за однакових умов культивування. Так, щільний міцеліальний шар (пухнастий, повстистий чи шерстистий) з високим повітряним міцелієм утворювався при культивуванні всіх штамів на натуральних середовищах (СА, КГА, ГПС). Росту щільніших колоній також сприяло додавання до синтетичного середовища L-аспарагіну та тіаміну. У той же час на усіх синтетичних середовищах (СЧ, СН, СС тощо), переважно спостерігали ріст міцелію у вигляді тонкого, нещільного шару. Додавання до агаризованого середовища ГПС вуглеводних (крохмаль, пектин або КМЦ) або білкових (казеїн або желатин) компонентів також впливало на морфологію колоній у досліджених штамів: на середовищах з казеїном, желатином та пектином у всіх штамів утворювалися перисті колонії, а на середовищах з крохмалем або КМЦ колонії були дуже тонкими, ледве помітними і росли дуже повільно.

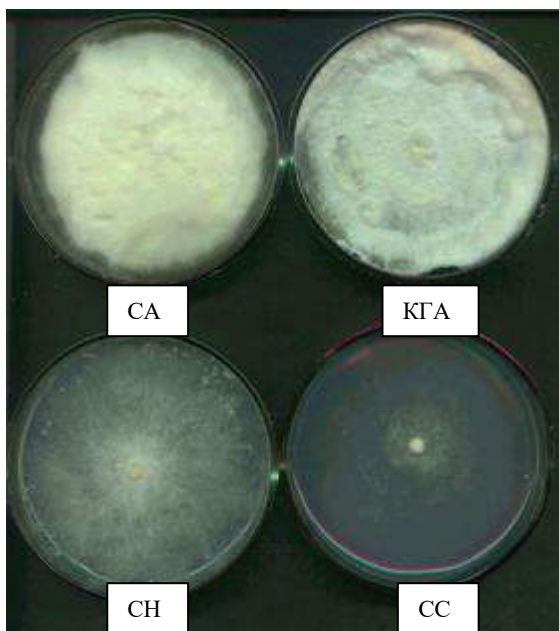


Рис. 2. Колонії *Grifola frondosa* 1705 на агаризованих живильних середовищах, за температури інкубації 28°C, (21 доба культивування)

Мінливість морфології колоній в залежності від складу середовища була встановлена також і для восьми штамів *G. frondosa* (рис. 2). Всі штами мали найщільніші колонії на СА. На середовищі КГА спочатку спостерігався ріст тонкого шару міцелію, що утворював досить прозору колонію, яка поступово ущільнювалася, починаючи з центру, і утворювала білий, пухнастий або ватоподібний повітряний міцелій. На середовищі СН у штамів *G. frondosa* спостерігався ріст тонких нещільних колоній з ділянками міцелію різної висоти. А на середовищі СС ріст був дуже слабкий і у колоній практично був відсутній повітряний міцелій. На початку росту *G. frondosa* міцелій у всіх досліджуваних штамів мав білий колір, але на 15-20 добу культивування при 20°C та 28°C на СА та КГА починали утворюватися тонкі

шкірясті зони жовтуватого або світло-рудого кольору.

3.3 Вплив температури інкубації на морфологію і швидкість радіального росту культур *Schizophyllum commune* та *Grifola frondosa*. Одним з важливих факторів оточуючого середовища, що впливає на

культуральні та фізіолого-біохімічні властивості грибів, є температура. За результатами проведених досліджень штамів *S. commune* та *G. frondosa* на середовищах СА, КГА, СН та СС за температур 4, 20, 28 та 37 ± 1 °C було встановлено, що морфологія міцеліальних колоній слабо змінювалася в залежності від температури. В той же час, біологічні особливості штамів проявлялися переважно в швидкості радіального росту міцелію.

Так, дослідження швидкості радіального росту на різних агаризованих середовищах у діапазоні від 4 до 37 °C дозволили встановити, що її максимальне значення для штамів *G. frondosa* досягає 4,8 мм/добу, для штамів *S. commune* — до 12 мм/добу за температури 28 °C, що є характерним відповідно для культур з середньою швидкістю росту та швидкоростучих видів базидієвих макроміцетів.

Загалом, в умовах культивування при 20, 28 та 37 °C, швидкість радіального росту більшості штамів *S. commune* була найбільшою на середовищі СА і становила від 4,1 до 12 мм/добу. На КГА у штамів V_R або статистично не відрізнялася від швидкості радіального росту на СА за однакової температури культивування, або була меншою – від 3,3 до 7,8 мм/добу ($p < 0,05$). На синтетичних середовищах (СН, СС, СЧ) значення швидкості радіального росту значною мірою залежали від штаму і складали від 2,0 до 8,3 мм/добу. При цьому, швидкість радіального росту при 28 °C у всіх штамів на усіх середовищах коливалась в більш широкому діапазоні, ніж при 20 °C, але мала достовірно вищі значення ніж при 20 та 37 °C.

На відміну від термостійкого виду *S. commune*, штами *G. frondosa* взагалі не росли за температури 37 °C. Швидкість радіального росту у більшості культур *G. frondosa* була вищою за температури 28 °C на середовищі СА (1,5-4,8 мм/добу), а найнижчою – на середовищі СС (0,2-1,5 мм/добу).

Також для 8 штамів *G. frondosa* та для 5 штамів *S. commune* було встановлено оптимальні для росту міцелію на середовищі СА температури. Визначено, що для 8 штамів *G. frondosa* оптимальною температурою є 26-28 °C. В той же час, для 5 штамів *S. commune* було виявлено значну штамову мінливість – оптимальна температура становила у двох штамів 28 °C, у одного – 30 °C, і у одного – 37 °C.

3.4 Вплив підвищених температур на життєздатність міцелію штамів *Schizophyllum commune* та *Grifola frondosa*. Важливою біологічною характеристикою штаму є здатність до збереження життєздатності міцелію за умов підвищених температур. В результаті виконаних досліджень було вперше встановлено, що максимальною температурою, за якою зберігається життєздатність вегетативного міцелію, для всіх досліджених штамів *S. commune*, була 57-58 °C, а для штамів *G. frondosa* — 35-36 °C.

3.5 Ферментативна активність штамів *Schizophyllum commune* та *Grifola frondosa*. Проведено скринінг культур за активністю ферментів різних класів з метою визначення штамових особливостей, а також для оцінки перспектив використання обраних штамів як продуцентів ферментних

препаратів. Виявлені різний спектр та ступінь прояву реакцій в залежності від виду та штаму і слабка залежність від температурних умов. У переважної більшості штамів *S. commune* було встановлено наявність гідролітичних ферментів всіх класів, але при цьому мало місце варіювання ступеню прояву активності ферменту в залежності від штаму. Особливо чіткі та інтенсивні позитивні реакції спостерігали у всіх штамів при визначенні ксиланази та глюкозидази і у 17 штамів при визначенні амілази та у 15 штамів – протеїнази. Всі штами *S. commune* також виявляли позитивну реакцію на лаказу та пероксидазу на середовищах СА та КГА. На середовищах СН та СС слабка позитивна реакція на пероксидазу та тирозиназу спостерігалася тільки у двох штамів.

На відміну від *S. commune* всі штами *G. frondosa* показали менше штамове різноманіття активності ферментів. При цьому була відзначена ліпазна, амілазна, целюлазна та глюкозидазна активності. Для всіх штамів був характерний слабкий або помірний рівень прояву активності казеїнази, протеїнази, пектат-транселімінази, полігалактуронази, уреазу і ксиланази. Активність окислювальних ферментів у штамів *G. frondosa* залежала від штаму і не залежала від складу середовища. Лаказна активність була встановлена у 5 штамів на всіх середовищах. Штами 1707 та 1790 на всіх живильних середовищах виявили також і тирозиназну активність. Пероксидазна активність у досліджуваних штамів *G. frondosa* виявлена не була.

За результатами проведених досліджень штамів на агаризованих середовищах, а саме за ростовими характеристиками та за спектром ферментативної активності, для подальшої роботи було обрано штами *S. commune* 441, 1760, 1767 та 5009 і *G. frondosa* 332, 962, 1790, 1794.

РОЗДІЛ 4. РІСТ ТА БІОСИНТЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* ТА *GRIFOLA FRONDOSA* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА РІДКИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

4.1. Фізіолого-біохімічні особливості штамів *Grifola frondosa* в умовах культивування на рідких живильних середовищах різного складу. Важливими факторами, що впливають на фізіологічний стан базидіоміцетів, є склад та кислотність середовища. Дослідження впливу кислотності на накопичення біомаси та екзополісахаридів для штамів *G. frondosa* виявило, що більшому виходу біомаси і отриманню більшої кількості екзополісахаридів в процесі культивування штамів 332, 962 та 1794 сприяє рН 5,4, штаму 1790 – рН 6,8.

При визначенні сприятливих для росту відібраних штамів *G. frondosa* джерел карбону на рідких живильних середовищах з оптимальним для накопичення біомаси рН було встановлено, що кращими для всіх культур були глюкоза та крохмаль. Максимальна кількість міцеліальної біомаси на середовищах з глюкозою та крохмалем спостерігалася у штаму 962 - $1,63 \pm 0,01$ г/дм³ та $1,48 \pm 0,06$ г/дм³ відповідно (рис. 3, а). Кращим джерелом нітрогену для всіх досліджених штамів *G. frondosa* був пептон (рис. 3, б).

Біомаса на середовищах з пептоном коливалась від $1,58 \pm 0,05$ г/дм³ до $2,51 \pm 0,20$ г/дм³. Серед неорганічних джерел нітрогену найсприятливішим виявився нітрат амонію – найбільша біомаса у штамів 1790 та 962 складала $1,48 \pm 0,05$ та $1,61 \pm 0,02$ г/дм³ відповідно (рис. 3, б).

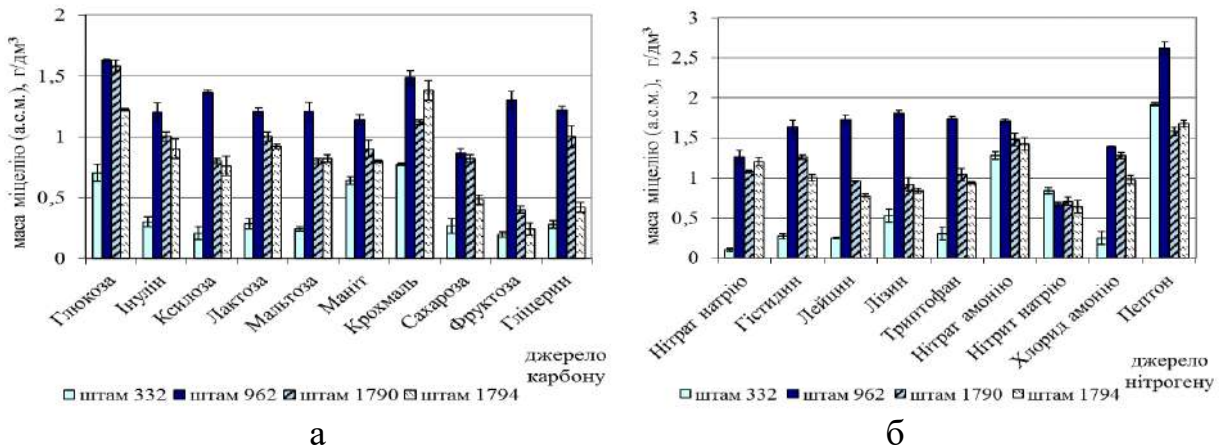


Рисунок 3. Накопичення біомаси штамами *Grifola frondosa* на синтетичному середовищі СС з різними джерелами карбону (а) та нітрогену (б), за температури $28 \pm 1^\circ\text{C}$, при поверхневому культивуванні (10 доба культивування)

Наступним етапом досліджень було встановлення в рідкому синтетичному середовищі концентрацій та співвідношення нітрогену та карбону, оптимальних для синтезу біомаси, екзо- та ендополісахаридів. Отримані результати свідчать про те, що для штамів *G. frondosa* сприятливими для отримання біомаси (до $3,5$ г/дм³), екзополісахаридів (до $0,08$ г/дм³) та ендополісахаридів (до $0,06$ г/дм³) є концентрація глюкози – 50 г/дм³, нітрату амонію – 4 г/дм³ і співвідношення С : N = 15 : 1.

Одним з напрямків підвищення біосинтетичної здатності гриба та збільшення рівня накопичення біомаси є додавання до синтетичних середовищ оптимальних за рН та співвідношенням карбону та нітрогену органічних домішок. Було встановлено, що для всіх штамів *G. frondosa* найбільше стимулювання синтезу біомаси відбувається при додаванні органічного азоту у вигляді пептону ($5,5$ г/дм³ у штаму 1790) (рис.4, а). Біосинтезу екзополісахаридів сприяло додавання до синтетичного середовища меляси ($3,5$ г/дм³ у штаму 1790) (рис.4, б).

В процесі культивування штамів *G. frondosa* на синтетичному середовищі з глюкозою та нітратом амонію з додаванням органічних сполук в культуральному фільтраті також було визначено динаміку активності енд-1,4- β -глюканази та екзоглюканази, а також рН, білку і редукуючих речовин.

Динаміка енд-1,4- β -глюканази у досліджених штамів *G. frondosa* мала складний характер протягом усього терміну культивування (13 діб) та характеризувалася декількома піками. Найвища активність цього ферменту у штамів спостерігалася на синтетичному середовищі з додаванням КЕ у штаму 332: $16,7 \pm 0,6$ $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$ на 10 добу. Активність екзоглюканази у штамів

G. frondosa на цих синтетичних середовищах з додаванням органічних сполук була дуже низькою і становила до 0,4-0,5 $\mu\text{M}/\text{год}\cdot\text{см}^3$.

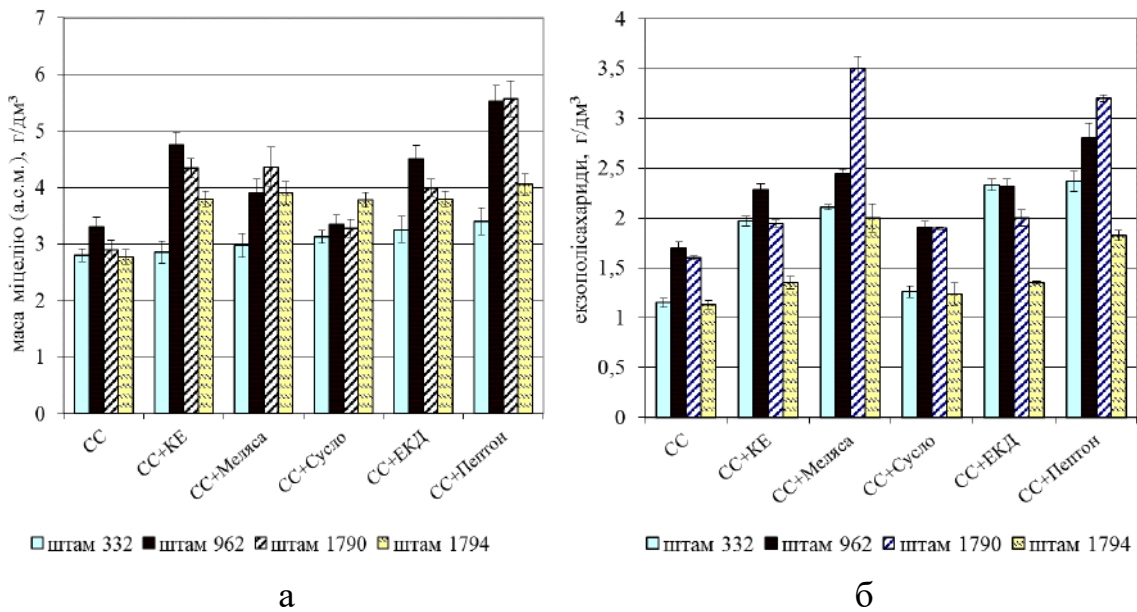


Рис. 4. Накопичення біомаси (а) та екзополісахаридів штамами *Grifola frondosa* на синтетичному середовищі SS з додаванням органічних сполук, при глибинному культивуванні, за температури $28\pm 1^\circ\text{C}$ (6 доба культивування)

Отже, прояв та рівень активності целюлолітичних ферментів, а також динаміка рН, білку та концентрації редуруючих речовин в культуральному фільтраті штамів *G. frondosa* залежали, в першу чергу, від складу середовища та пов'язані з наявністю речовин-індукторів та хімічною природою сполук, що є джерелами карбону та нітрогену для гриба.

За результатами проведених досліджень штамів *G. frondosa* на рідких живильних середовищах різного складу і розрахованих значень економічного коефіцієнту було обрано сприятливі для отримання біомаси, екзо- та ендополісахаридів умови глибинного культивування (табл.1).

Таблиця 1. Умови глибинного культивування штаму *G. frondosa* 1790, рекомендовані для накопичення біомаси, ендо- та екзополісахаридів

Параметри культивування	для отримання біомаси та ендополісахаридів	для отримання екзополісахаридів
NH_4NO_3 , г/дм ³	4	4
KH_2PO_4 , г/дм ³	1	1
K_2HPO_4 , г/дм ³	1	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г/дм ³	0,5	0,5
глюкоза, г/дм ³	50	50
пептон, г/дм ³	10	-
меляса, г/дм ³	-	10
вихідне рН	6,8	6,8
перемішування, об/хв	120	120
температура, °C	28	28
тривалість культивування, діб	5	6

4.2. Дослідження штамів *Schizophyllum commune* в умовах культивування на рідких живильних середовищах різного складу. Дослідження впливу рН рідких живильних середовищ на ріст штамів *S. commune* 441, 1760, 1767 та 5009 показало, що для отримання максимальної кількості екзополісахаридів у досліджуваних штамів необхідно створювати вихідне значення рН середовища 7,6-8,0, а для більшого накопичення біомаси – 5,4.

Визначення впливу джерел карбону на накопичення біомаси штамми *S. commune* дозволило встановити, що для штамів 441 та 1767 кращим джерелом карбону був гліцерин, для штамів 1760 та 5009 – глюкоза (відповідно 3,5-4,1 г/дм³ в залежності від штаму) (рис. 5, а). Кращим джерелом нітрогену для накопичення біомаси штамів 1760, 1767 та 5009 був пептон, а для штаму 441 – триптофан. Серед неорганічних джерел нітрогену найбільшому синтезу біомаси сприяв нітрат амонію (рис. 5, б).

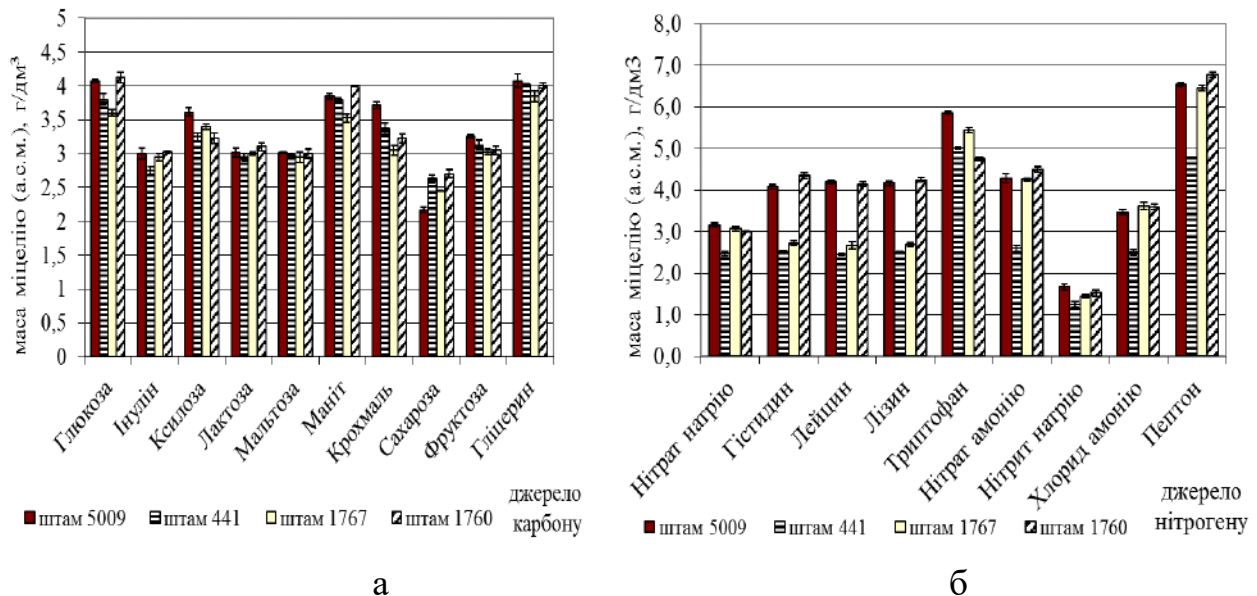


Рисунок 5. Накопичення біомаси штамми *Schizophyllum commune* на синтетичному середовищі СС з різними джерелами карбону (а) та нітрогену (б), за температури $28 \pm 1^\circ\text{C}$, при поверхневому культивуванні (7 доба культивування)

Культивування чотирьох штамів *S. commune* на синтетичному середовищі СС з різним співвідношенням нітрогену та карбону встановило, що для максимального накопичення біомаси необхідною є концентрація глюкози 30 г/дм^3 , нітрату амонію – 3 г/дм^3 , для максимальної кількості екзополісахаридів - 40 г/дм^3 та 4 г/дм^3 відповідно. При цьому співвідношення нітрогену до карбону становлять $12 : 1$ та $11 : 1$ відповідно.

Проведені дослідження штамів *S. commune* на синтетичному середовищі СС з додаванням органічних сполук показали, що найбільше накопичення міцеліальної біомаси спостерігалось у штаму *S. commune* 1760 на середовищах з пептоном та мелясою – $15,7 \pm 0,2$ та $15,5 \pm 0,3 \text{ г/дм}^3$ відповідно. Максимальна кількість екзополісахаридів встановлена також у штаму *S. commune* 1760 ($12,1 \pm 0,5 \text{ г/дм}^3$) на середовищі з кукурудзяним екстрактом (рис. 6, а, б).

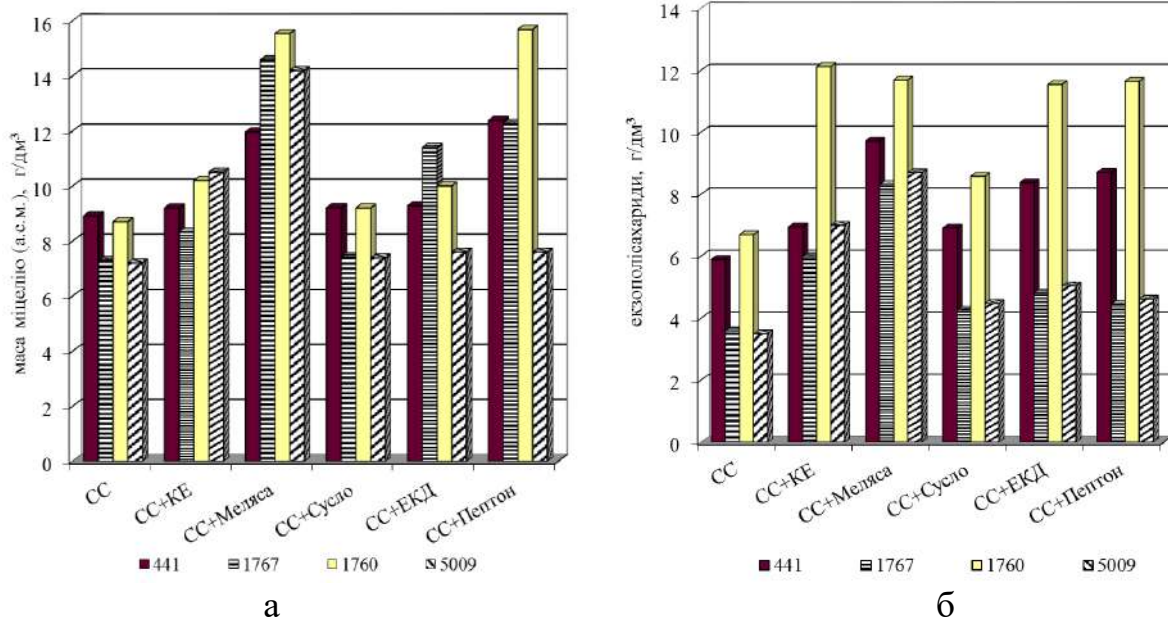


Рисунок 6. Накопичення біомаси (а) та екзополісахаридів (б) штамами *Schizophyllum commune* на синтетичному середовищі СС з додаванням органічних сполук при глибинному культивуванні за температури $28\pm 1^\circ\text{C}$ (6 доба культивування)

Динаміка рН, концентрації редуруючих речовин та білку на синтетичному середовищі СС з додаванням органічних сполук залежала від складу середовища і біологічних особливостей штаму. Максимальне значення активності ендо-1,4- β -глюканази склало $1223,5\pm 47,3$ мМ/(год·см³) у штаму *S. commune* 1760 на середовищі СС з КЕ (6 доба культивування), а екзоглюканази (також у штаму 1760) на середовищі СС з мелясою на 2 добу – 970 ± 26 мМ/год·см³.

За результатами проведених досліджень штамів *S. commune* при культивуванні на рідких живильних середовищах і за розрахованими значеннями економічного коефіцієнту було запропоновано параметри культивування відібраного штаму *S. commune* 1760 (табл. 2)

Таблиця 2. Умови глибинного культивування штаму *S. commune* 1760, рекомендовані для накопичення біомаси, ендо- та екзополісахаридів

Параметри культивування	для отримання біомаси	для отримання екзополісахаридів
NH ₄ NO ₃ , г/дм ³	3	4
KN ₂ PO ₄ , г/дм ³	1	1
K ₂ HPO ₄ , г/дм ³	1	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г/дм ³	0,5	
глюкоза, г/дм ³	30	40
пептон або меляса, г/дм ³	10	-
кукурудзяний екстракт, г/дм ³	-	10
вихідне рН	5,4	8,0
перемішування, об/хв	180	180
температура, °С	30	30
тривалість культивування, діб	5	4

4.3. Особливості біосинтезу ферментів целюлолітичного комплексу штамом *Schizophyllum commune* 5009 та їх практичне використання. Сучасна промисловість використовує велику кількість ферментних препаратів. Значну частку з них становлять ферменти целюлолітичної дії, які застосовуються там, де є необхідність переробки або модифікації сировини або напівпродуктів, що містять целюлозу. Однією з галузей, що потребує ферментних препаратів саме цієї групи є текстильна промисловість. Тому, для дослідження можливості застосування ферментних комплексів, що можуть бути застосованими для обробки бавовняних тканин, на підставі спектрів та інтенсивності ферментативних реакцій на агаризованих середовищах та даних щодо динаміки активності целюлолітичних ферментів був обраний штам *S. commune* 5009. Встановлено, що ендоглюканазна активність обраного штаму на рідкому середовищі Норкранс з індукторами (карбоксиметилцелюлоза, фільтрувальний папір, бавовняна нитка) варіювала від $4,5 \pm 0,2$ до $8,1 \pm 0,3$ мкмоль/(год·см³). Електрофорез у поліакриламідному гелі сконцентрованих зразків білків культуральних фільтратів досліджуваного штаму, показав наявність в п'яти білків з молекулярними масами 10-30 kDa, в тому числі з ендоглюканазною активністю.

Культуральний фільтрат штаму *S. commune* 5009 використовували для обробки бавовняних текстильних матеріалів. При цьому були підібрані кращі температура та рН (50°C, рН = 5,0, протягом 60 хв). Одночасно для порівняння проводили обробку зразків тканини комерційними препаратами в оптимальних для кожного умовах, наведених у їх специфікації. Встановлено, що зразки тканини, оброблені досліджуваним фільтратом та препаратами комерційних целюлаз, за всіма визначеними характеристиками мають порівнянні величини. Таким чином, аналіз фізико-механічних властивостей і результатів мікроскопії (SEM) текстильних зразків, оброблених досліджуваним ферментним комплексом *S. commune* 5009, дає підставу припускати ефективність його використання на фінішних стадіях виробництва бавовняних тканин на етапах відбілювання, шліфування, полірування.

4.4. Вплив екзополісахаридів *Schizophyllum commune* 1760 на культуру перещеплюваних клітин тестикул поросяти *in vitro*. Визначення впливу біологічно активних сполук на культури клітин людини або тварин *in vitro* є одним з етапів розробки безпечних препаратів, що можуть бути застосовані з лікувально-профілактичною метою. Оскільки перспективними БАР, що синтезуються *S. commune* є екзополісахариди, то було проведено культивування відібраного штаму *S. commune* 1760 в підібраних умовах (табл.2), з наступним виділенням та очищенням екзополісахаридного комплексу. В результаті отримано розчин екзополісахаридів в концентрації $9,1 \pm 0,2$ г/дм³. Після стерилізуючої фільтрації концентрація екзополісахаридів в розчині, що вносився в першу лунку мікропланшети з добовою моношаровою культурою ПТП становила $0,21 \pm 0,01$ мг/см³.

Облік результатів інкубування екзополісахаридів з культурою клітин ПТП через 24, 48 та 72 години показав відсутність цитопатичної дії

екзополісахаридного комплексу при всіх досліджених концентраціях (від $0,21 \cdot 10^{-2}$ до $0,21 \cdot 10^{-10}$ мг/см³). При цьому, окрім відсутності негативного впливу, спостерігався ефект стимуляції початку проліферації клітин ПТП в підтримуючому середовищі, тобто за зменшеної кількості ростових факторів (2,5 % ембріональної телячої сироватки). А саме, спостерігалось краще прикріплення та розпластування клітин при розведенні екзополісахаридного комплексу до $0,21 \cdot 10^{-8}$ мг/см³. Такий ефект може бути зумовлений стабілізацією мембран клітин ПТП, що сприяє розвитку перших етапів проліферації культури *in vitro*.

Таким чином, вперше було встановлено, що в низьких концентраціях екзополісахаридний комплекс з *S. commune* може бути використаний для покращення стабільності клітинних культур в підтримуючих умовах.

4.5. Молекулярно-генетичні дослідження штаму *Schizophyllum commune* 1760. Оскільки проведені нами дослідження дозволили обрати штам *S. commune* 1760, як продуцент для розробки біотехнології отримання біомаси та екзополісахаридного комплексу, то є важливим підтвердження видової приналежності запропонованого штаму сучасними молекулярно-біологічними методами. Визначення маркерної ДНК-послідовності гену малої рибосомальної субодиниці підтвердило видову приналежність штаму *S. commune* 1760.

ВИСНОВКИ

1. Дослідження морфолого-культуральних, фізіологічних та біосинтетичних особливостей лікарських ксилотрофних базидієвих макроміцетів *Schizophyllum commune* (21 штам, у тому числі 13 штамів, виділених дисертантом з базидієм, зібраних на території України) та *Grifola frondosa* (8 штамів) з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) дозволило отримати нові для науки відомості про біологію цих видів у культурі.

2. В результаті вивчення морфолого-культуральних ознак міцелію штамів *S. commune* та *G. frondosa* у процесі культивування на 15 агаризованих живильних середовищах встановлено залежність морфології колоній у першу чергу від складу живильного середовища та її варіювання у різних штамів одного й того ж виду. Методами світлового та сканувального мікроскопіювання також встановлено характерні для обох видів міцеліальні мікроструктури – пряжки та анастомози у штамів обох видів, та головчасті вирости у штамів *S. commune*.

3. Визначено, що швидкість радіального росту штамів *S. commune* та *G. frondosa* залежить і від температури і від складу агаризованого живильного середовища. Її максимальне значення, за температури 28 °С, для *S. commune* досягає 12 мм/добу (штами 1760 та 1767 на агаризованому пивному суслі), для *G. frondosa* — 4,8 мм/добу (штам 332 на агаризованому пивному суслі), що є характерним відповідно для швидкоростучих штамів та таких, що ростуть з середньою швидкістю.

4. Вперше встановлено, що максимальною температурою, за якою

зберігається життєздатність вегетативного міцелію, для всіх досліджених штамів *S. commune*, була 57-58 °С, а для штамів *G. frondosa* — 35-36 °С.

5. В результаті проведеного скринінгу штамів *S. commune* та *G. frondosa* за активністю ферментів різних класів виявлено різний ступінь прояву реакції у залежності від виду і штаму та слабка залежність від температурних умов. Встановлено, що у штамів *S. commune* переважає ксиланазна, глюкозидазна, амілазна, протеїназна, лаказна та пероксидазна активності, а для більшості штамів *G. frondosa* є характерною ліпазна, амілазна, целюлазна та лаказна ензиматична активність.

6. Отримані дані щодо впливу кислотності рідкого живильного середовища та різних джерел карбону та нітрогену на біосинтетичні властивості досліджених штамів свідчать про те, що сприятливими для накопичення біомаси значеннями рН для штамів *G. frondosa* – рН 5,4 – 6,8 (в залежності від штаму), а для *S. commune* рН 5,4. Вперше визначено кислотність рідкого живильного середовища, що сприяє біосинтезу екзополісахаридів: рН 5,4 – 6,8 для штамів *G. frondosa* і рН 7,6 – 8,0 для *S. commune*. В результаті дослідження впливу різних джерел карбону і нітрогену у рідкому живильному середовищі на біосинтетичні властивості встановлено, що максимальному накопиченню біомаси сприяють для штамів *G. frondosa* глюкоза або крохмаль і пептон, а для штамів *S. commune* – глюкоза або гліцерин та пептон і триптофан.

7. Вперше визначено вплив різних співвідношень джерел карбону (глюкоза) і нітрогену (нітрат амонію) та їх концентрацій у рідкому живильному середовищі на біосинтетичні властивості *S. commune* та *G. frondosa*. Встановлено, що сприятливим для отримання біомаси, ендо- та екзополісахаридів для штамів *G. frondosa* є співвідношення С : N = 15 : 1, а для штамів *S. commune* кращими для накопичення біомаси є співвідношення нітрогену та карбону у живильному середовищі С : N = 12 : 1, а для біосинтезу екзополісахаридів — С : N = 11 : 1.

8. Отримані дані щодо впливу органічних сполук, що були додані до рідкого синтетичного живильного середовища з глюкозою та нітратом амонію на біосинтетичні властивості штамів *S. commune* та *G. frondosa* виявили, що найбільший рівень накопичення біомаси був встановлений для штаму *S. commune* 1760 (15,5-15,7 г/дм³) на середовищах з додаванням пептону або меляси і для штаму *G. frondosa* 1790 (5,5 г/дм³) на середовищі з додаванням пептону. Біосинтезу екзополісахаридів сприяло для *S. commune* 1760 (12,12 г/дм³) додавання у середовище кукурудзяного екстракту, а для штаму *G. frondosa* 1790 — меляси (3,5 г/дм³).

9. Дослідження динаміки активності целюлолітичних ферментів, концентрації редуруючих речовин, білку та рН у культуральних фільтратах за умов глибинного культивування на рідких синтетичних середовищах з глюкозою, нітратом амонію та з додаванням органічних сполук штамів *G. frondosa* та *S. commune* виявили залежність цих показників від складу середовища, а також від виду та штаму.

10. Встановлено, що за комплексом досліджених ознак найбільш перспективними для біотехнологічного застосування є штами *S. commune* 1760

та *G. frondosa* 1790. Визначено умови їх культивування, що сприяють високому виходу біомаси та екзополісахаридів.

11. З застосуванням молекулярно-біологічного методу визначення маркерної ДНК-послідовності гену малої рибосомальної субодиниці підтверджено видову приналежність штаму *S. commune* 1760.

12. Вперше досліджено можливість практичного застосування біологічно активних речовин з *S. commune* (екзополісахаридні та ферментні комплекси) у текстильній промисловості та для культивування клітин тварин *in vitro*. А саме, показана перспективність ефективного використання екзоферментного комплексу *S. commune* 5009 для обробки текстильних бавовняних тканин для їх полірування, шліфування та відбілювання. Також було вперше виявлено стимулюючий вплив екзополісахаридного комплексу штаму *S. commune* 1760 на культуру перещеплюваних клітин тестикул поросяти *in vitro*, що може бути використано для покращення стабільності клітинних культур у підтримуючих умовах.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у іноземних рецензованих виданнях, що індексуються Web of Science та Scopus

1. Buchalo A.S., Didukh M.Y., Mykchaylova O.A., Lynovitska V.M. Microstructures in Medicinal Mushroom Cultures. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2005. Vol. 7. P. 389-390.

Статті у наукових фахових виданнях інших держав

1. Клечак И.Р., Линовицкая В.М., Дзыгун Л.П., Малюк А.М. Ферментативная активность высших базидиальных грибов при культивировании на агаризованных средах. *Международный научно-практический рецензируемый журнал Иммунология, аллергология, инфектология*. 2009. № 2. С. 182-183.
2. Тодосийчук Т.С., Кокол В., Дзыгун Л.П., Линовицкая В.М. Скрининг новых продуцентов целлюлолитических ферментных комплексов для процессов производства ткани. *Биотехнология*. 2011. № 6. С. 38-46.
3. Бисько Н.А., Линовицкая В.М., Митропольская Н.Ю. Влияние повышенных температур на жизнеспособность мицелия штаммов лекарственного базидиального гриба *Schizophyllum commune* Fr. *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2017. Vol. 2, No. 1. P. 112-116.

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Ліновицька В.М., Бухало А.С. Дослідження культур лікарського гриба *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F.Gray (*Basidiomycetes, Polyporaceae*) на агаризованих живильних середовищах. *Український ботанічний журнал*. 2004. Т. 61, № 2. С. 41–48.
2. Ліновицька В.М., Бухало А.С. Культуральні та морфологічні особливості лікарського гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) на агаризованих живильних середовищах. *Український ботанічний журнал*. 2005. Т. 62, № 1. С. 78–86.

3. Ліновицька В.М., Бухало А.С. Ріст і біосинтетична активність *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F.Gray та *Schizophyllum commune* Fr. у глибинній культурі. *Український ботанічний журнал*. 2008. Т. 65, № 1. С. 116–123.
4. Ліновицька В.М., Бухало А.С., Дуган О.М. Підбір умов глибинного культивування *Grifola frondosa* як основи для створення біотехнологій отримання лікувально-профілактичних препаратів. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2011. № 3. С. 56-60.
5. Бухало А.С., Дзигун 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.
6. Бухало А.С., Ліновицька В.М. Культивування вищого базидіального гриба *Schizophyllum commune* на агаризованих живильних середовищах. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2014. № 3. С. 7-11.
7. Дзигун Л.П., Ліновицька В.М. Отримання міцеліальної біомаси лікувальних грибів *Grifola frondosa* та *Laetiporus sulphureus* на синтетичних середовищах. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2019. Vol. 3, no. 4. P. 239–245. DOI: <https://doi.org/10.20535/ibb.2019.3.4.186329>.

Статті в інших наукових виданнях України:

1. Бухало А.С., Дуган О.М., Максимюк М.Р., Ліновицька В.М. Ферментативна активність вищого базидіального гриба *Grifola frondosa*. *Вісник Національного авіаційного університету*. 2011. № 2. С. 155-161.
2. Ліновицька В.М., Бухало А.С., Швед О.М., Дуган О.М. Створення біотехнології отримання екзополісахаридів на основі глибиного культивування вищого базидіоміцету *Schizophyllum commune*. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка», серія Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2011. № 700. С. 161-172.
3. Бухало А.С., Дуган О.М., Максимюк М.Р., Ліновицька В.М. Ферментативна активність вищого базидіального гриба *Schizophyllum commune*. *Вісник Національного авіаційного університету*. 2012. № 3. С. 154-159.
4. Ліновицька В.М. Біотехнологія екзополісахаридів з вищого базидіоміцету *Schizophyllum commune*. *Технологический аудит и резервы производства*. 2012. № 6/2 (8). С. 49-50.

Матеріали та тези доповідей

у міжнародних і всеукраїнських конференціях:

1. Ліновицька В.М., Культивування вищих базидіоміцетів на щільних поживних 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. Buchalo A.S., Wasser S.P., Linovitska V.M. Cultural and microscopic studies of *Schizophyllum commune* and *Grifola frondosa* (higher basidiomycetes) strains isolated in Ukraine. Book of Abstracts. *The 7-th International Mycological Congress*. Oslo, 11-17 August, 2002. P. 193.

3. Linovitska V.M. Buchalo A.S. Studies on medicinal mushroom *Grifola frondosa* in pure culture. XIV CEM Abstracts : *XIV Congress of European Mycologists*, Katsiveli, Yalta, Crimea, Ukraine, 22-27 September, 2003. – P. 23.
4. Kokol V., Todosiychuk T., Dzygun L., Linovytska V. Screening of New Microbial Producers of Enzymes for their Use in Textile Finishing Processes. *3rd International Conference on Textile Biotechnology INTB'04 : Book of abstracts*. Graz, University of technology, Austria, June 13 — 14. Technische Universitat TUG, 2004. – P. 37.
5. Линовицкая В.М., Дзыгун Л.П., Клечак И.Р., Бухало А.С. Высшие базидиальные грибы *Schizophyllum commune* и *Laetiporus sulphureus* как объект современной биотехнологии. *Успехи медицинской микологии*. Т. 7. М.: Национальная академия микологии, 2006. С. 246-249.
6. Бухало А.С., Клечак И.Р., Линовицкая В.М. Активность эндо-1,4-β-глюканазы высшего базидиального гриба *Schizophyllum commune* Fr. в условиях глубинного культивирования. *Фундаментальные исследования в технических университетах : Материалы X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы, 18-19 мая 2006 года, Санкт-Петербург : Изд-во Политехнического университета. 2006. С. 375.*
7. Бухало А.С., Клечак И.Р., Линовицкая В.М. Исследование особенностей роста высшего базидиального гриба *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F.Gray на комплексных средах. *Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии : Материалы Международной научной конференции, 1-2 июня 2006, Минск — Раков. Минск : ОДО «Новап rint». С. 167-169.*
8. Buchalo A.S., Klechak I.R., Linovytska V.M. Particularities of production exopolysaccharides of *Grifola frondosa* and *Schizophyllum commune* in conditions of submerged cultures. *XV Congress of European Mycologists : Abstracts*. Saint Petersburg, Russia, September 16-21, 2007. St Petersburg : TREEART LLC, 2007. P. 182-183.
9. 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*. Москва : ООО Изд-во «Восток – Запад», 2008. С. 38-52.
10. 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 (Минск, 2-6 июня 2008 г). В 2-х томах. Т.1., Минск, 2008. С. 253-255.*
11. Klechak I., Linovytska V., Garmash S., Maluk O. Particularities of production exopolysaccharides by Hight Basidiomycetes Lignotrophic mushrooms in Submerged Cultures. Abstracts of 21st CODATA International Conference,

Scientific Information for Society-from Today to the Future, Ukraine, Kyiv, 5-8 October, 2008. P. 176 — 177.

12. 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*. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. Москва : Национальная академия микологии, 2008. С. 335.
13. Гайовий Ю., Ліновицька В. Ріст вищого базидіоміцету *Schizophyllum commune* на агаризованих середовищах. *Молодь і поступ біології* : збірник тез VI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (21-24 вересня 2010 року, м. Львів). Львів, 2010. С. 52-53.
14. Бухало А.С., Гуцол О.В., Дуган О.М., Ліновицька В.М. Глибинне культивування вищого базидіоміцету *Grifola frondosa*. *XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім.С.М.Виноградського* : Тези доповідей. 1-6 жовтня 2013 рік, Ялта, 2013. Сімферополь : ФОРМ Бразнікової Н.А., 2013. С. 70.
15. Івануха О.М., Ліновицька В.М. Біотехнологія отримання біомаси вищого базидіального гриба *Grifola frondosa*. *Біотехнологія XXI століття* : тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченій 170 річниці від дня народження Іллі Мечникова (Київ, 24 квітня 2015р.), Міністерство освіти і науки України, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. Київ : НТУУ «КПІ», 2015. С. 44.
16. Нечаєва Я.О., Ліновицька В.М. Протипухлинні полісахариди грибного походження. *Біотехнологія XXI століття* : матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016). Міністерство освіти і науки України, Національний технічний університет України «КПІ», Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. Київ : НТУУ «КПІ», 2016. С.59.
17. Бісько Н.А., Ліновицька В.М., Біологічні особливості рідкісного лікарського гриба *Grifola frondosa* (*Meripilaceae, Polyporales*) у культурі. *Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронних стратегій* : Матеріали IV Міжнародної конференції (16-20 травня 2016 р., Київ, Україна). Київ : ПАЛИВОДА А.В., 2016. С. 171-174.
18. Ліновицька В.М., Чубук А.О. Гриби-термофіли відділу *Basidiomycota*. *Біотехнологія XXI століття* : матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 21 квітня 2017), Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во «Політехніка», 2017. С. 46.
19. Ліновицька В.М., Бісько Н.А. Культурально-морфологічні особливості штамів *Schizophyllum commune* Fr. (*Schizophyllaceae, Agaricales*), виділених в культуру з природних локалітетів Карпат. *Природоохоронні, історико-культурні та екоосвітні аспекти збалансованого розвитку Українських*

- Карпат* : Матеріали міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 15-ій річниці НПП «Гуцульщина» (м. Косів, Івано-Франківська обл., 8-9 червня 2017 року), Косів : ПП Павлюк М.Д., 2017. С. 231-236.
20. Бісько Н.А., Ліновицька В.М., Полозюк Ю.В. Вплив температури на ріст лікарського гриба *Grifola frondosa* (*Meripilaceae*, *Polyporales*) у глибинній культурі. *Національний науковий простір : перспективи, інновації, технології*: Матеріали V Всеукраїнської заочної науково-практичної конференції «Національний науковий простір: перспективи, інновації, технології» (м. Харків, 13 – 14 квітня 2018 року). Наукове партнерство «Центр наукових технологій». Харків : НП «ЦНТ», 2018. С. 3-8.
21. Бісько Н.А., Ліновицька В.М., Полозюк Ю.В. Біологічні особливості рідкісного лікарського гриба *Grifola frondosa* (*Meripilaceae*, *Polyporales*) у культурі за різних температур. *Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження Глобальної стратегії збереження рослин* : Матеріали V Міжнародної конференції (25-28 червня 2018 р., Херсон, Україна). Херсон : книжкове вид-во ФОП Вишемирський В.С., 2018. С. 146-148.
22. Ліновицька В.М., Федоренко Я.А., Глибинне культивування базидієвого гриба *Schizophyllum commune* за різних умов перемішування. *Сучасний рух науки* : тези доп. VII міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 6-7 червня 2019 р. Дніпро, 2019. С. 1016-1019. URL: <http://www.wayscience.com/wp-content/uploads/2019/07/Zbirnik-7-mizhnarodna-naukovo-praktichna-internet-konferentsiya.pdf>. (дата звернення: 27.07.2020).

Повний перелік наведено у дисертаційній роботі

АНОТАЦІЯ

Ліновицька В.М. Біологія лікарських базидієвих макроміцетів *Schizophyllum commune* Fr. та *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray в умовах культури. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю **03.00.21 «Мікологія»**. — Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженням морфолого-культуральних, фізіологічних та біосинтетичних особливостей 21 штаму *Schizophyllum commune* та 8 штамів *Grifola frondosa* різного географічного походження з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК), у тому числі 13 штамів *S. commune*, виділених дисертантом з базидієм, зібраних на території України.

В результаті проведених досліджень штамів *S. commune* і *G. frondosa* встановлено особливості морфології колоній, мікроморфологію міцелію та визначено радіальну швидкість росту міцелію при культивуванні на 15 агаризованих живильних середовищах.

Вперше встановлено, що максимальною температурою, за якої зберігається життєздатність вегетативного міцелію, у всіх досліджених штамів *S. commune*, була 57-58°C, а для штамів *G. frondosa* — 35-36°C.

Проведено скринінг штамів *S. commune* та *G. frondosa* за активністю

ферментів різних класів та виявлені різний спектр та ступінь прояву реакцій в залежності від виду і штаму.

За умов культивування на рідких живильних середовищах визначено сприятливі для накопичення міцелію та біосинтезу екзополісахаридів значення рН та джерела карбону і нітрогену.

Досліджено вплив органічних сполук, що додаються до рідкого синтетичного живильного середовища з глюкозою та нітратом амонію на біосинтетичні властивості видів. В тому числі були отримані дані, щодо динаміки активності целюлолітичних ферментів, концентрації редуруючих речовин, білку та рН у культуральному фільтраті штамів *G. frondosa* та *S. commune*.

Встановлено, що за комплексом досліджених ознак найбільш перспективними для біотехнологічного застосування є штами *S. commune* 1760 та *G. frondosa* 1790. Визначено умови їх культивування, що сприяють високому виходу біомаси та екзополісахаридів. З застосуванням молекулярно-біологічного методу визначення маркерної ДНК-последовності гену малої рибосомальної субодиниці підтверджено видову приналежність штаму *S. commune* 1760.

Вперше досліджено можливість практичного застосування біологічно активних речовин з *S. commune* (екзополісахаридні та ферментні комплекси) у текстильній промисловості та для культивування клітин тварин *in vitro*.

Ключові слова: мікологія, штами, міцелій, мікроструктури, культурально-морфологічні особливості, швидкість росту, культивування, ферменти, полісахариди

АННОТАЦИЯ

Линовицкая В.М. Биология лекарственных базидиальных макромицетов *Schizophyllum commune* Fr. и *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray в культуре. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.21 «Микология». - Институт ботаники им. М.Г.Холодного НАН Украины, Киев, 2020.

Диссертация посвящена исследованию морфолого-культуральных, физиологических и биосинтетических особенностей 21 штамма *Schizophyllum commune* и 8 штаммов *Grifola frondosa* разного географического происхождения из коллекции культур шляпочных грибов (ИВК), в том числе 13 штаммов *S. commune*, выделенных диссертантом из базидиом, собранных на территории Украины.

В результате проведенных исследований штаммов *S. commune* и *G. frondosa* установлены особенности морфологии колоний, микроморфология мицелия и определена радиальная скорость роста мицелия при культивировании на 15 агаризованных питательных средах.

Впервые установлено, что максимальной температурой, при которой сохраняется жизнеспособность вегетативного мицелия, для всех исследованных штаммов *S. commune*, была 57-58 °С, а для штаммов *G. frondosa* - 35-36 °С.

Проведен скрининг штаммов *S. commune* и *G. frondosa* по активности ферментов разных классов и выявлен различный спектр и степень проявления реакций в зависимости от вида и штамма.

В условиях культивирования на жидких питательных средах определены благоприятные для накопления мицелия и биосинтеза экзополисахаридов значения рН, а также источники углерода и азота.

Исследовано влияние органических соединений, добавленных к жидкой синтетической питательной среде с глюкозой и нитратом аммония на биосинтетические свойства видов. В том числе были получены данные относительно динамики активности целюлолитических ферментов, концентрации редуцирующих веществ, белка и рН в культуральном фильтрате штаммов *G. frondosa* и *S. commune*.

Установлено, что по комплексу исследованных признаков наиболее перспективными для биотехнологического применения являются штаммы *S. commune* 1760 и *G. frondosa* 1790. Определены условия их культивирования, способствующие высокому выходу биомассы и экзополисахаридов. С применением молекулярно-биологических методов определения маркерной ДНК-последовательности гена малой рибосомальной субъединицы подтверждено видовую принадлежность штамма *S. commune* 1760.

Впервые исследована возможность практического применения биологически активных веществ из *S. commune* (экзополисахаридные и ферментные комплексы) в текстильной промышленности и для культивирования клеток животных *in vitro*.

Ключевые слова: микология, штаммы, мицелий, микроструктуры, культурально-морфологические особенности, скорость роста, культивирования, ферменты, полисахариды

SUMMARY

Linovytska V.M. Biology of medicinal basidial macromycetes *Schizophyllum commune* Fr. and *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray in culture. — Qualifying scientific work, manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of biological sciences (doctor of philosophy) on a specialty **03.00.21 "Mycology"**. — M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the research of morphological-cultural, physiological, and biosynthetic features of 21 strains of *Schizophyllum commune* and 8 strains of *Grifola frondosa* of different geographical origin from the IBK Mushroom Culture Collection, M.G.Kholodny Institute of Botany of National

Academy of Science of Ukraine, including 13 strains of *S. commune* isolated by the author from the fruit bodies collected in Ukraine.

As a result of the conducted researches of 21 strains *S. commune* and 8 strains *G. frondosa* the peculiarities of colony morphology and micromorphology were established and the radial rate of mycelial growth during cultivation on 15 agar nutrient media was determined. It was found that the morphology of colonies of both species depends primarily on the composition of agar media and may differ in various strains of the same species.

Studies of the radial growth rate on different agar media in from 4 to 37°C revealed that its maximum value for *G. frondosa* was 4.8 mm / day, for *S. commune* — up to 12 mm / day at a temperature of 28°C, which is characteristic of cultures with an average speed of growth and fast-growing species of basidial macromycetes, respectively.

For the first time it was found that the maximum temperature at which the viability of the vegetative mycelium is maintained in all studied strains of *S. commune* was 57-58 ° C, and for strains of *G. frondosa* — 35-36 ° C.

S. commune and *G. frondosa* strains were screened for the activity of different classes enzymes in order to determine the strain characteristics, as well as to assess the prospects of using selected strains as producers of enzyme preparations. Different spectrum and various degrees of reaction depending on the strain and weak dependence on temperature are revealed. It was found that xylanase, glucosidase, amylase, proteinase, laccase and peroxidase activities are more characteristic of *S. commune* strains, and lipase, amylase, cellulase and laccase activity are more characteristic of *G. frondosa*.

Under the conditions of cultivation on liquid nutrient media, favorable for the mycelial growth pH values were determined: for strains of *G. frondosa* — pH 5.4 — 6.8 (depending on the strain), and for *S. commune* pH 5.4. Also, for the first time, the acidity of the nutrient media that promotes the biosynthesis of exopolysaccharides was determined: pH 5.4 — 6.8 for *G. frondosa* strains and pH 7.6-8.0 for *S. commune*.

Among the ten sources of carbon and nine sources of nitrogen, used in the nutrient liquid media, glucose or starch and peptone have been shown to contribute to the growth of biomass by *G. frondosa* strains. At the same time, it was first determined that the ratio of nitrogen and carbon in the nutrient medium to obtain biomass, endo- and exopolysaccharides from *G. frondosa* should be C: N = 15: 1.

Among ten sources of carbon and nine sources of nitrogen, the presence of glucose or glycerol and peptone or tryptophan in the nutrient medium stimulates the growth of biomass by *S. commune* strains. Besides, for the first time, it was established that for the maximum accumulation of mycelial biomass the ratio of nitrogen and carbon in the nutrient medium C: N = 12: 1 is necessary, and for the maximum amount of exopolysaccharides — C: N = 11: 1.

The influence of organic compounds added to the liquid synthetic nutrient media on the biosynthetic properties of species has been studied. The highest level of biomass accumulation was found on media with peptone or molasses for strain *S. commune* 1760 (15.5-15.7 g/dm³) and on media with peptone for strain

G. frondosa 1790 (5.5 g/dm³). The biosynthesis of exopolysaccharides was maximal in *S. commune* 1760 (12.12 g/dm³) on a medium with corn extract, and in *G. frondosa* 1790 on a medium with molasses (3.5 g/dm³).

Data were obtained on the dynamics of the activity of cellulolytic and oxidative enzymes, as well as the concentration of reducing substances, protein and, pH in the culture filtrate of *G. frondosa* and *S. commune* strains when cultured on synthetic media with the addition of organic compounds and revealed dependence, primarily on the composition of the environment and variability of different strains and species.

According to the complex of studied traits, promising for biotechnological application strains of *S. commune* 1760 and *G. frondosa* 1790 were selected, and the conditions of their cultivation to obtain target products — biomass and exopolysaccharides were determined. The species affiliation of the *S. commune* 1760 strain was confirmed using the molecular-biological method of sequence determination of the small subunit ribosomal DNA gene.

For the first time, the possibility of effective use of the *S. commune* 5009 exoenzyme complex for the machining of textile cellulose materials was investigated. The protein composition of the complex was determined and the optimal temperature of its conduction (+ 50 ° C) was established. Analysis of physical and mechanical properties and microscopy results of textile samples treated with the studied exoenzyme complex *S. commune* 5009, suggests the effectiveness of its use at the final stages of production of cellulose fabrics: bleaching, grinding, polishing.

The effect of the *S. commune* exopolysaccharide complex on the culture of transplanted pig testicular cells *in vitro* was established for the first time. The obtained data allow recommending the use of exopolysaccharide complex *S. commune* in low concentrations to improve the stability of cell cultures in supportive conditions.

Key words: mycology, strains, mycelium, microstructures, cultural and morphological features, growth rate, cultivation, enzymes, polysaccharides