

СКРИНІНГ ШТАМІВ ЛІКАРСЬКОГО ГРИБА *FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL.) BONDARTSEV & SINGER, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ

О.Б. Михайлова¹, Н.Л. Поєдинок^{2*}, В.М. Щетинін³

¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

²КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

³Wonderbrands Inc., Micicaga, Канада

*Corresponding author: n.poyedinok@gmail.com

Received 30 December 2022; Accepted 24 January 2023

Проблематика. Розвиток індустрії культивування макроміцетів сприятиме виробництву біотехнологічних продуктів на основі грибів. Встановлення основних факторів, що регулюють процеси життєдіяльності лікарських макроміцетів дає змогу контролювати біосинтетичну активність грибного організму *in vitro* й отримувати біотехнологічні продукти на його основі.

Мета. Проведення скринінгу штамів *F. officinalis*, перспективних для біотехнологічного використання, та визначення фізико-хімічних чинників, які регулюють процеси життєдіяльності культур.

Методика реалізації. Об'єктом дослідження були штами *Fomitopsis officinalis* (IBK-2497, IBK-2498, IBK-5004), які зберігаються у Колекції культур (IBK). Визначали вплив кислотності середовища, потреби культур у джерелах вуглецевого й азотного живлення. Використовували джерела вуглецю: моносахариди (глюкоза, ксилоза), ди- (сахароза, лактоза), три- (рафіноза), полісахариди (крохмаль); азоту: KNO₃; (NH₄)₂HPO₄; аспарагін, пептон. Динаміку росту культур досліджували за умов глибинного культивування на рідкому глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі (ГПД), г/л: глюкоза – 30,0; пептон – 3,5; дріжджовий екстракт – 2,0; KH₂PO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,25.

Результати. Найсприятливішим для активного росту всіх досліджених штамів *F. officinalis* є рН 5,5–6,0. Найкращими для росту джерелами вуглецю є глюкоза і крохмаль, азоту – пептон і аспарагін. Найменш придатні для росту середовища з ксилозою, лактозою та нітратним азотом. Аналіз динаміки росту на середовищі ГПД показав, що найбільшу масу міцелію (до 11,54 ± 0,2 г/л) продукувала культура *F. officinalis* IBK-5004 на 10-ту добу культивування. Культури *F. officinalis* IBK-2497, IBK-2498 накопичували 10,33 ± 0,2 і 9,68 ± 0,3 г/л відповідно на 14-ту добу культивування.

Висновки. На основі отриманих даних відібрано штам *F. officinalis* IBK-5004, який за комплексом ознак можна вважати перспективним продуцентом міцеліальної маси. Штам має характерні морфолого-культуральні ознаки та хорошу продуктивність.

Ключові слова: *Fomitopsis officinalis*; глибинна культура; міцеліальна маса; живильне середовище.

Вступ

Пріоритетними напрямками сучасної біотехнології та фармакології стають пошук і всебічне вивчення потенційних продуцентів біологічно активних речовин широкого спектра дії. У медичній біотехнології все частіше почали використовувати макроміцети з доведеними лікувальними властивостями. Фармацевтичні компанії розглядають лікарські макроміцети як багате джерело інноваційних біомедичних молекул, які отримують не лише з плодівих тіл, але й з міцеліальної маси та культуральної рідини [1]. Саме ксилотрофні макроміцети на сьогодні розглядають як перспективні об'єкти для виробництва низки фармакологічних препаратів [2–4]. Основне місце серед препаратів із лікарських макроміцетів посідають протира-

кові, імуностимулювальні, гепатопротекторні, серцево-судинні лікарські засоби та харчові добавки [3, 5, 6].

Одним із перспективних об'єктів біотехнології є ксилотрофний макроміцет *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer, відомий у медичній практиці як “модринова губка” або “трутовик лікарський”. Мікохімічні дослідження складу плодівих тіл, вегетативного міцелію та культуральної рідини *F. officinalis* дали змогу ізолювати цілу низку вторинних метаболітів [7–10]. Ідентифіковано понад 50 різноманітних біологічно активних сполук, зокрема гетерополісахариди, тритерпеноїди ланостанового типу, сесквітерпеноїди дриманового типу, стероли, кумарини, органічні кислоти, фенольні сполуки, сполуки індолу, фітогормони, флавоноїди тощо [11–21]. Спектр виявленої

фармакологічної активності трутовика лікарського дуже широкий. Численними дослідженнями доведено, що *F. officinalis* можна використовувати як джерело антибактеріальних, протигрибкових, протизапальних, протипухлинних, противірусних та імуностимулювальних засобів [22–27].

Залежно від розширення знань про мікохімію, біотехнологію та молекулярну біологію лікарських макроміцетів, удосконалення методів скринінгу (високопродуктивний скринінг, геноміка та протеоміка) можна очікувати на швидке збільшення застосування грибів у медичних цілях [1, 27]. Досягнення в галузі біотехнологічного культивування макроміцетів сприятимуть розвитку та застосуванню мікофармацевтичних препаратів у біомедицині.

Основним біотехнологічним методом отримання вторинних метаболітів із лікувальними властивостями з грибів є використання біосинтетичної здатності міцеліальних культур. Перевагами культивування за умов глибинної культури є незалежність від зовнішніх факторів, компактність виробництва, здатність безперервно отримувати якісний продукт із заданими властивостями [1, 4]. Знання основних чинників, що регулюють процеси життєдіяльності, дає змогу контролювати найважливіші функції грибного організму *in vitro*. Практичне втілення нових біотехнологій на основі міцеліальних культур макроміцетів потребує розширення фундаментальних знань про їхні біологічні особливості, закономірності росту, біосинтетичної активності, визначення оптимальних умов культивування, вдосконалення методів скринінгу перспективних продуцентів.

Метою роботи було проведення скринінгу штамів *F. officinalis*, перспективних для біотехнологічного використання, та визначення фізико-хімічних чинників, які регулюють процеси життєдіяльності грибного організму і дають змогу контролювати найважливіші його функції.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були чисті культури трьох штамів *Fomitopsis officinalis* (IBK-2497, IBK-2498, IBK-5004) різного географічного походження, які зберігаються у Колекції культур шапинкових грибів (IBK) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [28].

Культивування на рідких живильних середовищах проводили в поверхневій культурі в колбах Ерленмеєра ємністю 250 мл, які містили

50 мл середовища. Інокуляцію проводили за допомогою дисків із міцелієм. Вносили 14-добові культури, попередньо вирощені на глюкозо-пептон-дріжджовому (ГПД) агарі, г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дріжджовий екстракт – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; агар-агар – 20,0, рН 6,0. У кожну колбу з рідким середовищем вносили по п'ять міцеліальних дисків ($d = 6$ мм). Культури інкубували у стаціонарних умовах. Масу міцелію визначали на момент, коли в одному з варіантів міцелій повністю покривав поверхню середовища. Біомасу фільтрували та висушували за температури $60 \pm 0,1$ °С до постійної ваги. Також визначали кінцеве значення рН культуральної рідини [29, 30].

При визначенні впливу кислотності середовища, потреб досліджених культур у джерелах вуглецевого й азотного живлення використовували рідке синтетичне середовище такого складу, г/л: глюкоза – 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,003; ZnCl_2 – 0,005. Значення кислотності середовища змінювали в інтервалі від 2,0 до 8,0 з кроком 1 за допомогою розчинів 1н КОН і 1н НСІ. Контрольні вимірювання початкового значення рН середовища проводили після стерилізації. Джерелами вуглецю були моносахариди (глюкоза, ксиліоза), дисахариди (сахароза, лактоза) і трисахариди (рафіноза), полісахариди (крохмаль), які додавали в середовища в кількостях, еквівалентних 20,0 г глюкози за вуглецем, рН 6,0. Джерелами азоту слугували KNO_3 ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; аспарагін, пептон, які вносили в середовища у кількості, еквівалентній 3,0 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ за азотом [30]. Вплив на ріст міцелію *F. officinalis* різних концентрацій глюкози (25,0; 30,0; 35,0 г/л) та пептону (3,0; 3,5; 4,0 г/л) проводили в стаціонарних умовах за температури $26 \pm 0,1$ °С.

Глибинне культивування проводили в колбах Ерленмеєра ємністю 500 мл, що містили 100 мл рідкого середовища, в умовах струшування на качалці за 120 рух./хв, температура інкубації 26 ± 1 °С. Використовували рідке живильне середовище ГПД, г/л: глюкоза – 30,0; пептон – 3,5; дріжджовий екстракт – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25. Інокуляцію проводили гомогенізованим фізіологічно активним міцелієм за методикою, розробленою для міцеліальних грибів [31] у об'ємній кількості 10 %. Перед інокуляцією

проводили мікробіологічний контроль чистоти живильного середовища і посівного матеріалу.

Аналіз біомаси та культуральної рідини. При дослідженні динаміки росту кожні 3 доби визначали кількість маси міцелію, міцелій висушували за температури 60 °С до постійної ваги [31].

Продуктивність штамів щодо накопичення міцеліальної маси визначали як кількість міцеліальної маси, утвореної на одиницю об'єму живильного середовища впродовж певного часу культивування [30].

Методи статистичної обробки. Усі досліди проводили в трьох повторностях. Одержані кількісні результати при порівняльному вивченні штамів на рідких живильних середовищах опрацьовано за допомогою комп'ютерної програми MS Excel 2010. Розраховували значення середніх квадратичних відхилень, коефіцієнтів варіації, довірчих інтервалів, у межах яких варіювали значення отриманої міцеліальної маси. У таблицях і на рисунках наведені середні статистично достовірні дані за 95 % імовірності.

Результати

Визначення оптимальних значень рН середовища для кожного штаму є необхідним етапом у біотехнології, оскільки це впливає на продуктивність процесу. Для більшості видів ксилотрофних лікарських макроміцетів придатними для росту вегетативного міцелію *in vitro* є рН у межах 5,5–6,5 [31–34].

Дослідження росту культур *F. officinalis* на живильному середовищі в діапазоні рН від 2,0 до 8,0 показали, що кислотність середовища є фактором, який регулює ріст міцелію штамів *F. officinalis*. Ріст міцелію спостерігали в діапазоні рН 4,0–7,0. У процесі росту культур

F. officinalis рН середовища знижувався до значень 3,7–4,2. Найсприятливішим для активного росту всіх досліджених штамів *F. officinalis* є рН у межах 5,5–6,0. За цих значень рН найактивнішими виявився штам *IBK-5004*, вихід біомаси становив понад $4,8 \pm 0,3$ г/л а.с.м. на 21-шу добу культивування у стаціонарних умовах (табл. 1). Культури *IBK-2497* і *IBK-2498* у процесі росту накопичували меншу кількість біомаси ($4,1 \pm 0,3$ г/л а.с.м.). За показником кислотності середовища рН > 7,5 усі культури припиняли ріст.

Досліджено вплив різних джерел вуглецевого живлення на ріст штамів *F. officinalis*. Як єдине джерело вуглецю на синтетичному живильному середовищі ми досліджували: моносахариди – глюкозу, ксилозу; дисахариди – сахарозу, лактозу; трисахариди – рафінозу; полісахариди – крохмаль. Контрольним було живильне середовище з глюкозою. Накопичення маси міцелію у досліджених культур відрізнялося на живильних середовищах із різними джерелами вуглецю. Проте з'ясовано, що для всіх досліджених культур кращими джерелами вуглецю є глюкоза і крохмаль (табл. 2).

Лактоза була добрим джерелом вуглецю, але маса міцелію (до 2,8 г/л) не перевищувала таку на живильних середовищах із крохмалем і глюкозою. Всі досліджені культури гірше засвоювали сахарозу та рафінозу порівняно з глюкозою і крохмалем.

Усі досліджені штами *F. officinalis* споживали ксилозу дуже слабко. Під час росту культур на середовищах із різними джерелами вуглецевого живлення значення рН зменшувалось.

Зниження кислотності живильного середовища залежало переважно від природи джерела вуглецю і швидкості його використання

Таблиця 1: Ріст штамів *Fomitopsis officinalis* за визначених оптимальних значень кислотності живильного глюкозо-пептон-дріжджового середовища (21-ша доба культивування)

Штам	Значення рН		Максимальна маса міцелію, г/л (а.с.м.)
	Вихідне значення рН	Кінцеве значення рН	
<i>IBK-5004</i>	$5,5 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,3^*$
<i>IBK-2497</i>	$6,0 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2^*$
<i>IBK-2498</i>	$6,0 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,3^*$

* – статистично достовірні відмінності між дослідженими штамми ($p \leq 0,05$), результати представлені як $M \pm n$, $n = 3$.

Таблиця 2: Ріст штамів *Fomitopsis officinalis* на синтетичному живильному середовищі з різними джерелами вуглецю (а.с.м., г/л)

Штам	Джерело вуглецю					
	Глюкоза	Ксилоза	Сахароза	Лактоза	Рафіноза	Крохмаль
<i>IBK-2497</i>	$4,1 \pm 0,2^*$	$1,1 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,2^*$	$2,6 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,3^*$	$4,0 \pm 0,2^*$
<i>IBK-2498</i>	$3,7 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,3^*$	$2,4 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2^*$	$3,4 \pm 0,3^*$
<i>IBK-5004</i>	$4,8 \pm 0,4^*$	$1,3 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3^*$	$4,7 \pm 0,2^*$

* – статистично достовірні відмінності між дослідженими штамми ($p \leq 0,05$), результати представлені як $M \pm n$, $n = 3$.

грибом. На середовищах із повільним споживанням джерел вуглецю, зокрема крохмалю, рН знижувався в процесі росту штамів меншою мірою (рН 4,0–4,5), ніж на середовищах із глюкозою (рН 3,5–4,0).

Таким чином, у ході дослідження встановлено, що найліпшими для росту міцелію більшості досліджених штамів *F. officinalis* є глюкоза і крохмаль, інші досліджені джерела вуглецю (ксилозу, сахарозу, рафінозу й лактозу) штами *F. officinalis* засвоювали гірше.

Подальшим етапом досліджень було встановлення впливу джерел азоту на ріст культур *F. officinalis*. На синтетичному живильному середовищі з глюкозою як джерело азоту використовували амонійний ((NH₄)₂HPO₄), нітратний (KNO₃) та органічний (аспарагін і пептон) азот. Дослідження росту штамів *F. officinalis* на середовищі з різними джерелами азоту показало, що більшу кількість міцеліальної маси всі досліджені штами накопичували на середовищах із органічними джерелами азоту (аспарагін і пептон). На них культури накопичували до 4,7 г/л біомаси на 21-шу добу культивування (рис. 1). Найактивнішим виявився штам *IBK-5004*. Встановлено, що хоча всі досліджені культури засвоювали як амонійний, так і нітратний азот, але продукцію більшої маси міцелію спостерігали на живильних середовищах з амонійним азотом.

Важливим фізико-хімічним чинником, який впливає на ріст і метаболізм грибів, є співвідношення вуглецю й азоту в живильному середовищі. Встановлено, що для росту більшості базидієвих макроміцетів оптимальним є спів-

відношення С:N у межах від 5:1 до 20:1 [34]. Досліджено вплив різних концентрацій глюкози (20,0; 25,0; 30,0; 35,0 г/л) на ріст міцелію *F. officinalis* за умов стаціонарної культури (рис. 2). Найбільшу масу міцелію культури *F. officinalis* накопичували за концентрації глюкози 30,0 г/л на 21-шу добу культивування. Збільшення кількості глюкози в середовищі до 35,0 г/л обмежувало процеси росту. Наприклад, на середовищі, яке містило 30,0 г/л глюкози, найактивнішим виявився штам *IBK-5004*, який накопичував понад 9,0 г/л біомаси, тоді як за концентрації глюкози 35,0 г/л кількість біомаси зменшувалась до 8,0 г/л.

Наступним етапом роботи було дослідити ріст культур за концентрації глюкози 30,0 г/л і концентрацій пептону 3,0; 3,5 і 4,0 г/л.

Встановлено, що найбільша кількість міцеліальної маси *F. officinalis* нагромаджувалась за концентрації пептону 3,5 г/л за постійної концентрації глюкози 30,0 г/л. Збільшення концентрації пептону в живильному середовищі з 3,5 до 4,0 г/л не привело до збільшення біомаси, і її кількість статистично не відрізнялася. Таким чином, встановлено, що кращі результати за виходом міцеліальної маси в культур *F. officinalis* були отримані на рідкому живильному середовищі за концентрації глюкози 30,0 г/л і пептону 3,5 г/л.

Наступним етапом дослідження було подальше визначення фізіологічних особливостей росту культур *F. officinalis* на рідкому живильному середовищі за умов глибинного культивування.

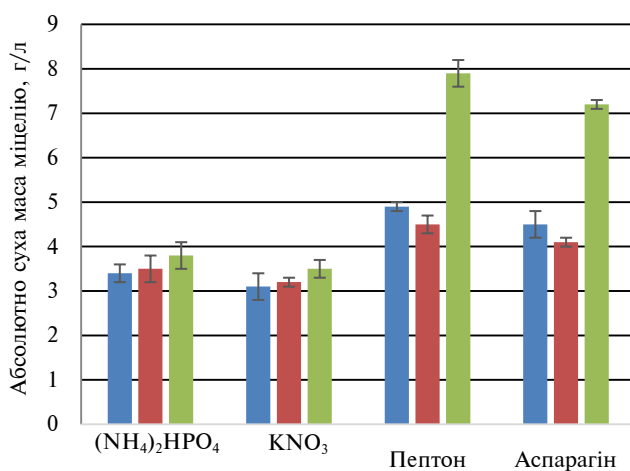


Рисунок 1: Ріст штамів *Fomitopsis officinalis* на синтетичному живильному середовищі з різними джерелами азоту на 21-шу добу культивування: ■ – *IBK-2497*; ■ – *IBK-2498*; ■ – *IBK-5004*

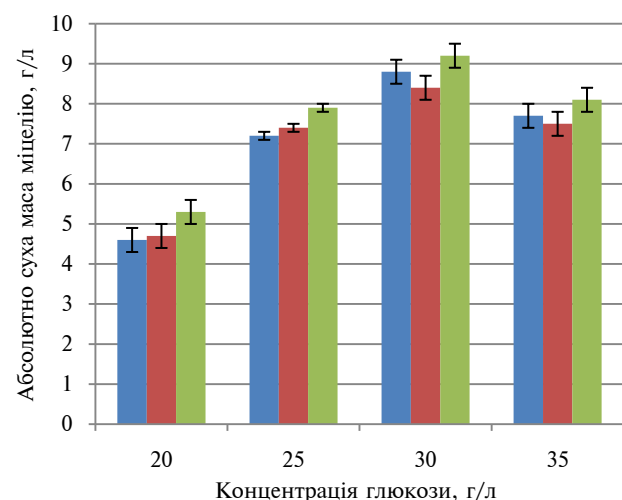


Рисунок 2: Ріст штамів *Fomitopsis officinalis* на середовищах з різною концентрацією глюкози на 21-шу добу культивування: ■ – *IBK-2497*; ■ – *IBK-2498*; ■ – *IBK-5004*

При дослідженні динаміки росту культур встановлено, що лаг-фаза росту штамів *F. officinalis* припадає на 3-тю добу культивування. Після лаг-фази швидкість накопичення міцеліальної маси збільшувалася, що характерно для фази активного росту. Максимальна кількість міцеліальної маси утворювалась при культивуванні на ГПД на 14–16-ту добу. Після експоненціальної фази, яка тривала 5 діб, залежно від штаму збільшення маси міцелію продовжувалось, але зі значно меншою швидкістю, що, можливо, пов'язано з погіршенням кисневого обміну. Для *F. officinalis* 5004, стаціонарна фаза тривала 2 доби, а для *F. officinalis* 2497, 2498 – 3, після чого активний ріст припинявся і кількість біомаси поступово знижувалась у результаті автолізу.

Аналіз динаміки росту досліджених штамів на живильному середовищі ГПД, яке містило 30,0 г/л глюкози й органічний азот (пептон, дріжджовий екстракт), показав, що найбільшу масу міцелію в умовах експерименту (до $11,54 \pm 0,2$ г/л) продукувала культура *F. officinalis* 5004 на 10-ту добу культивування. Культури *F. officinalis* 2497, 2498 росли повільніше, а міцеліальна маса становила $10,33 \pm 0,2$ і $9,68 \pm 0,3$ г/л відповідно на 14-ту добу культивування (рис. 3).

У процесі росту культур активна кислотність живильного середовища ГПД змінювалась поступово до рН 4,0–3,8 за початкового значення рН 6,0.

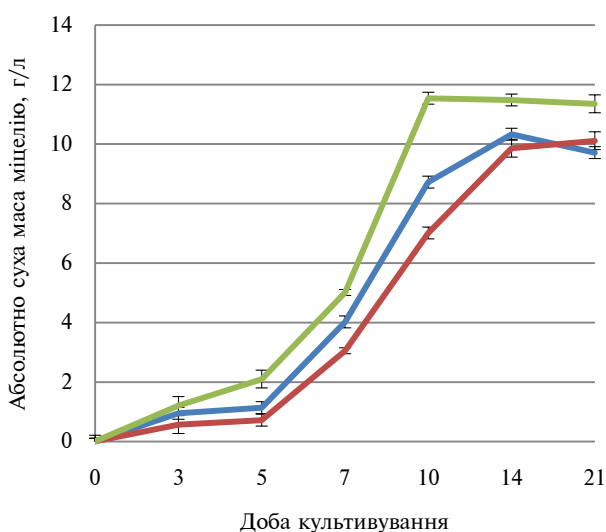


Рисунок 3: Динаміка росту культур *F. officinalis* на глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі за умов глибинного культивування: — IBK-2497; — IBK-2498; — IBK-5004

Крім динаміки росту культур *F. officinalis*, розраховано продуктивність накопичення міцеліальної маси. Найбільші показники були отримані для культури *F. officinalis* IBK-5004 – 1,4 г/л/добу а.с.м. Продуктивність штамів IBK-2497 і IBK-2498 не перевищувала 0,8 г/л/добу.

Обговорення

Вивчення факторів регуляції росту продуцентів біологічно активних речовин та оптимізації умов їх глибинного культивування приділяли увагу як ми [30–34], так і багато інших дослідників [35–40]. Згідно з даними наукової літератури, більшість опублікованих праць щодо *F. officinalis* присвячена дослідженню мікохімічного складу [11–20] та фармакологічних властивостей вторинних метаболітів плодових тіл або міцеліальної маси [8–10, 16, 21–27]. Проте умови культивування цього виду *in vitro* досліджені фрагментарно. Для отримання міцеліальної маси *F. officinalis* нами проведено попередній скринінг штамів-продуцентів і встановлено основні параметри культивування (кислотність середовища, джерела вуглецю й азоту та їх співвідношення), які забезпечать отримання високоякісного кінцевого продукту в необхідній кількості. Аналіз даних літератури щодо культивування *F. officinalis* на рідких живильних середовищах дав змогу встановити, що для отримання міцеліальної маси використовували натуральні та синтетичні середовища різного складу [37–39].

За даними наукової літератури [38, 40] відомо, що культури *F. officinalis* добре споживають глюкозу, мальтозу і крохмаль. У роботі [38] досліджували ріст *F. officinalis* на рідких живильних середовищах у стаціонарних умовах. Максимальний вихід міцеліальної маси відбувався на пивному суслі з додаванням 1 % модринової тирси на 50-ту добу культивування і становив понад 14,0 г/л. За результатами наших досліджень кращими джерелами вуглецю виявились глюкоза та крохмаль. Максимальна кількість міцелію нагромаджувалась на 21-шу добу культивування за стаціонарних умов.

У роботі [39] було визначено сприятливі умови для росту *F. officinalis* на рідких живильних середовищах різного складу за умов глибинного культивування. Автором визначено, що досліджений штам гриба здатний рости в доволі широкому діапазоні значень рН – від 3,7 до 7,6. У процесі росту культури кислотність середовища знижувалась до значень 3,7.

У ході дослідження було встановлено, що на натуральних живильних середовищах, які містили пшеничну, кукурудзяну та соєву муку, молочну сироватку, ріст гриба був дуже повільним, кількість міцеліальної маси не перевищувала 1,0 г/л на 20-ту добу культивування. У той же час на синтетичному середовищі, де джерелом вуглецю була глюкоза, азоту – нітрат амонію та додатково вносили пивне сусло як стимулятор росту, урожай міцеліальної маси сягав 7,1 г/л. В умовах нашого експерименту ріст міцелію досліджених штамів спостерігали в діапазоні рН від 4,0–7,0, що залежить від фізіологічних особливостей досліджених культур. Максимальна кількість міцеліальної маси на середовищі, що містило глюкозу, пептон і дріжджовий екстракт (додаткове джерело вуглецю та азоту) утворювалась при культивуванні на 14–16-ту добу (залежно від штаму) і становила понад 10 г/л.

У праці [40] отримували іммобілізований міцелій *F. officinalis* спільним культивуванням штаму модринової губки та продуцента бактеріальної целюлози *Gluconacetobacter hansenii* на натуральному середовищі Maltax-10 та синтетичному середовищі з глюкозою, дріжджовим екстрактом і сульфатом амонію за умов стаціонарної культури. При культивуванні монокультури *F. officinalis* максимальний вихід міцеліальної маси не перевищував 5,0 г/л, за умов змішаної культури максимальний вихід становив понад 11,0 г/л на 30-ту добу культивування.

Нещодавно [37] визначили вплив неорганічних солей цинку та магнію на ріст та біосинтетичну активність у *F. officinalis* в умовах глибинного культивування. Як джерело вуглецю для отримання міцеліальної маси автори використовували глюкозу, джерелом азоту слугували фосфорнокислий амоній і аспарагін. Максимальний вихід міцеліальної маси спостерігали на 10-ту добу культивування. Таким чином, згідно з даними інших дослідників, для культивування штамів *F. officinalis in vitro* як найкращі джерела вуглецю використовують глюкозу і крохмаль, азоту – пептон і аспарагін.

Аналіз наукової літератури щодо інших представників роду *Fomitopsis* P. Karst., зокрема *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai (syn. *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst.) та *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. виявив низку загальних та індивідуальних особливостей росту на рідких живильних середовищах [32, 41–43]. Встановлено, що при культивуванні *F. betulina in vitro* найкращим джере-

лом вуглецю для накопичення максимальної кількості біомаси були глюкоза і крохмаль, азоту – пептон, дріжджовий екстракт. Кислотність середовища – в діапазоні 5,5–6,0 [32].

У роботі [43] для виду *F. pinicola* визначено температуру інкубації, рН, джерела вуглецю, азоту та мінералів. Оптимальні температура і рН для росту міцелію та продукції екзополісахаридів становили 25 °С, кислотність середовища – у межах 5,5–6,0. Встановлено, що серед різних протестованих джерел вуглецю, глюкоза є найкращим джерелом. Максимальний ріст міцелію та продукцію екзополісахаридів спостерігали за концентрації глюкози 4 %. Найкращими джерелами азоту були дріжджовий екстракт і солодовий екстракт. Оптимальні концентрації дріжджового екстракту та солодового екстракту становили 0,5 та 0,1 % відповідно. У живильне середовище рекомендовано додавати K_2HPO_4 та $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, які є найкращими мінеральними джерелами для росту міцеліальної маси та продукування екзополісахаридів. Максимальна кількість міцеліальної маси та екзополісахаридів становила 7,9 і 2,6 г/л відповідно на 11-ту добу культивування. Крім того, проведено культивування у біореакторі. Максимальна кількість міцелію становила 10,4 г/л, максимальна концентрація екзополісахаридів – 4,4 г/л [43].

Таким чином, проведені нами експериментальні дослідження дали змогу встановити штамоспецифічні особливості росту культур *F. officinalis*. Отримані нами результати узгоджуються із даними науковців, які досліджували інших представників роду *Fomitopsis* на рідких живильних середовищах. Відібрана культура *F. officinalis* IBK-5004 відповідає вимогам щодо штамів-продуцентів базидієвих грибів [31], а саме: систематичний статус культури на рівні виду підтверджено молекулярно-генетичними методами. Отримані дані внесені до міжнародного GenBank, NCBI (Національного центру біотехнологічної інформації Національного інституту здоров'я США: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>, код доступу MF952886 – ізолят *F. officinalis* IBK-5004) [44]. У результаті попереднього комплексного дослідження встановлено наявність у штаму *F. officinalis* IBK-5004 характерних ознак, за якими можна контролювати чистоту культури на всіх етапах культивування [44]; продуктивність продуцента при первинному скринінгу при культивуванні на качалці на сприятливому живильному середовищі – не менше ніж

1,0 г/л/добу сухої біомаси. Культура *F. officinalis* IBK-5004 здатна засвоювати дешеві, нетоксичні живильні середовища.

Для отримання міцеліальної маси *F. officinalis* рекомендовано використовувати рідке живильне середовище з глюкозою (30,0 г/л), пептоном (3,5 г/л), кислотність 5,5–6,0, температура культивування 26 °С.

Подальші наші дослідження будуть спрямовані на встановлення біологічно активних речовин, зокрема ендополісахаридів, жирно-кислотного складу й ароматичних речовин міцеліальної маси *F. officinalis*.

Висновки

Досліджено фізіологічні властивості трьох штамів цінного лікарського гриба *F. officinalis* за різних умов культивування.

Встановлено сприятливі для росту міцелію значення рН середовища та джерел вуглецевого й азотного живлення. Максимальну продукцію маси міцелію *F. officinalis* виявлено у діапазоні рН 5,5–6,0. Найліпшими для росту міцелію досліджених штамів джерелами вуглецю є глюкоза і крохмаль, азоту — пептон. Найменш

придатні для росту живильні середовища із ксилозою, лактозою та нітратним азотом.

Досліджено вплив різних концентрацій глюкози (25,0; 30,0; 35,0 г/л) та пептону (3,0; 3,5 і 4,0 г/л) на ріст міцелію *F. officinalis*. Найбільшу масу міцелію культури *F. officinalis* накопичували за концентрації глюкози 30,0 г/л та пептону 3,5 г/л на 10-ту (IBK-5004) і 14-ту (IBK-2497, IBK-2498) добу культивування.

На основі отриманих даних відібрано найактивніший штам — *F. officinalis* IBK-5004, який за комплексом ознак можна вважати перспективним продуцентом міцеліальної маси. Штам має характерні морфологічні структури, які дають змогу здійснювати контроль чистоти культури, і хорошу продуктивність.

Розкриття інтересів

Наталія Поєдинок є членом редакційної колегії журналу “Innovative Biosystems and Bioengineering”, не брала участі у редакційному оцінюванні та ухваленні рішення про публікацію статті. Інші автори не мають конфліктів інтересів, які слід розкрити.

References

- [1] Badalyan SM, Rapior S. Perspectives of biomedical application of macrofungi. *Curr Trends Biomedical Eng Biosci*. 2020;19(5):556024. DOI: 10.19080/CTBEB.2020.19.556024
- [2] Gupta S, Summuna B, Gupta M, Annepu SK. Edible mushrooms: cultivation, bioactive molecules, and health benefits. In: Mérillon JM, Ramawat KG, editors. *Bioactive molecules in food*. Springer International Publishing; 2018. pp. 1-33. DOI: 10.1007/978-3-319-54528-8_86-1
- [3] Badalyan SM, Barkhudaryan A, Rapior S. Recent progress in research on the pharmacological potential of mushrooms and prospects for their clinical application. In: Agrawal D, Dhanasekaran M, editors. *Medicinal mushrooms*. Singapore: Springer; 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-6382-5_1
- [4] Deshmukh SK, Sridhar KR, Badalyan SM, editors. *Fungal biotechnology: prospects and avenues*. 1st edition. CRC Press; 2022. DOI: 10.1201/9781003248316
- [5] De Silva DD, Rapior S, Sudarman E, Stadler M, Xu J, Alias AS, et al. Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Divers*. 2013;62(1):1-40. DOI: 10.1007/s13225-013-0265-2
- [6] Hyde KD, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, Niego AGT, et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Divers*. 2019;97(1):1-136. DOI: 10.1007/s13225-019-00430-9
- [7] Grienke U, Zöll M, Peintner U, Rollinger JM. European medicinal polypores—a modern view on traditional uses. *J Ethnopharmacol*. 2014 Jul 3;154(3):564-83. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.030
- [8] Girometta C. Antimicrobial properties of *Fomitopsis officinalis* in the light of its bioactive metabolites: a review. *Mycology*. 2018 Oct 25;10(1):32-9. DOI: 10.1080/21501203.2018.1536680
- [9] Fijałkowska A, Muszyńska B, Sułkowska-Ziaja K, Kala K, Pawlik A, Stefaniuk D, et al. Medicinal potential of mycelium and fruiting bodies of an arboreal mushroom *Fomitopsis officinalis* in therapy of lifestyle diseases. *Sci Rep*. 2020 Nov 18;10(1):20081. DOI: 10.1038/s41598-020-76899-1
- [10] Muszyńska B, Fijałkowska A, Sułkowska-Ziaja K, Włodarczyk A, Kaczmarczyk P, Nogaj E, et al. *Fomitopsis officinalis*: A species of arboreal mushroom with promising biological and medicinal properties. *Chem Biodivers*. 2020 Jun;17(6):e2000213. DOI: 10.1002/cbdv.202000213

- [11] Wu X, Yang J, Zhou L, Dong Y. New lanostane-type triterpenes from *Fomes officinalis*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2004 Nov;52(11):1375-7. DOI: 10.1248/cpb.52.1375
- [12] Wu X, Yang JS, Yan M. Four new triterpenes from fungus of *Fomes officinalis*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2009 Feb;57(2):195-7. DOI: 10.1248/cpb.57.195
- [13] Hwang CH, Jaki BU, Klein LL, Lankin DC, McAlpine JB, Napolitano JG, et al. Chlorinated coumarins from the polypore mushroom *Fomitopsis officinalis* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. J Nat Prod. 2013 Oct 25;76(10):1916-22. DOI: 10.1021/np400497f
- [14] Feng W, Yang JS. A new drimane sesquiterpenoid and a new triterpene lactone from fungus of *Fomes officinalis*. J Asian Nat Prod Res. 2015;17(11):1065-72. DOI: 10.1080/10286020.2015.1054378
- [15] Sha AL. Effects of the *Fomes officinalis* flavonoids on anti-senile action in the aging model mice. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. 2016 Feb 8;32(2):121-3. DOI: 10.13459/j.cnki.cjap.2016.02.007
- [16] Han JX, Yuan T. Two new triterpenoid acids from Uighur medicine *Fomes officinalis*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2017 Apr;42(7):1225-8. DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20170224.021
- [17] Naranmandakh S, Murata T, Odonbayar B, Sukanuma K, Batkhuu J, Sasaki K. Lanostane triterpenoids from *Fomitopsis officinalis* and their trypanocidal activity. J Nat Med. 2018 Mar;72(2):523-9. DOI: 10.1007/s11418-018-1182-1
- [18] Golovchenko VV, Khramova DS, Shinen N, Jamsranjav G, Chizhov AO, Shashkov AS. Structure characterization of the mannofucogalactan isolated from fruit bodies of Quinine conk *Fomitopsis officinalis*. Carbohydr Polym. 2018 Nov 1;199:161-9. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.06.103
- [19] Vedenicheva NP, Al Maali GA, Mykhaylova OB, Lomberg ML, Bisko NA, Shcherbatiuk MM, et al. Endogenous cytokinins dynamics in mycelial biomass of basidiomycetes at different stages of cultivation. Int J Biochem Physiol, 2018;3(2):000122. DOI: 10.23880/ijbp-16000122
- [20] Vedenicheva NP, Al-Maali GA, Bisko NA, Shcherbatiuk MM, Lomberg ML, Mytropolska NY, et al. Comparative analysis of cytokinins in mycelial biomass of medicinal mushrooms. Int J Med Mushrooms. 2018;20(9):837-47. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018027797
- [21] Ren L, Perera C, Hemar Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. Food Funct. 2012 Nov;3(11):1118-30. DOI: 10.1039/c2fo10279j
- [22] Vazirian M, Faridfard S, Eftekhari M. "Gharikon"/"Agharikon" a valuable medicinal mushroom in Iranian traditional medicine. Iran J Med Sci. 2016; May;41(3 Suppl):S34.
- [23] Vitak T, Yurkiv B, Wasser S, Nevo E, Sybirna N. Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabetes mellitus. World J Diabetes. 2017 May 15;8(5):187-201. DOI: 10.4239/wjd.v8.i5.187
- [24] Golembiovska OI, Galkin AY, Besarab AB. Development and validation of a dissolution test for ursodeoxycholic acid and taurine from combined formulation. Sci Study Res Chem Chem Eng Biotechnol Food Ind. 2019;20(3):377-94.
- [25] Elkhateeba WA, Dabaa GM, Elnahasa MO, Thomasb PW. *Fomitopsis officinalis* mushroom: ancient gold mine of functional components and biological activities for modern medicine. Egypt Pharm J. 2019;18(4):285-9. DOI: 10.4103/epj.epj_46_19
- [26] Mykhaylova O, Poyedinok N. Antimicrobial activity of *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer in pure culture. Innov Biosyst Bioeng. 2021;5(4):220-7. DOI: 10.20535/ibb.2021.5.4.246668
- [27] Panter F, Bader CD, Мyller R. Synergizing the potential of bacterial genomics and metabolomics to find novel antibiotics. Chem Sci. 2021;12(17):5994-6010. DOI: 10.1039/d0sc06919a
- [28] Bisko N, Lomberg M, Mykhaylova O, Mytropolska N. IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.2. The IBK Mu-shroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany [Data file]. M.G. Kholodny Institute of Botany; 2020 [cited 2021 Apr 15]. DOI: 10.15468/dzdsqu
- [29] Bilay VI, editor. Methods of experimental mycology. Kyiv: Naukova Dumka; 1982. 550 p.
- [30] Bisko NA, Babitskaya VG, Bukhalo AS, Krupoderova TA, Lomberg ML, Mykhaylova OB, et al. Biological features of medicinal macromycetes in culture. Vol. 2. Kyiv: Altpres; 2012. 459 p.
- [31] Buchalo AS. Higher edible Basidiomycetes in pure culture. Kyiv: Naukova Dumka; 1988. 144 p.
- [32] Mykhaylova O, Lomberg M, Krasinko V. Biotechnological basis of intensive cultivation of medicinal mushroom *Fomitopsis betulina* (Fomitopsidaceae, Polyporales). Sci Works NUFT. 2021;27(1):32-41. DOI: 10.24263/2225-2924-2021-27-1-5
- [33] Poyedinok NL, Tugay TI, Tugay AV, Mykhaylova OB, Sergiichuk NN, Negriyko AM. Influence of nitrogen concentration on photoinduced growth, enzymatic activity and melanine synthesis by *Inonotus obliquus* (Ach.: Pers.) Pilót. Biotechnol Acta. 2019;12(4):34-41. DOI: 10.15407/biotech12.04.034
- [34] Bisko N, Mustafin K, Al-Maali GA, Suleimenova Z, Lomberg M, Narmuratova Z, et al. Effects of cultivation parameters on intracellular polysaccharide production in submerged culture of the edible medicinal mushroom *Lentinula edodes*. Czech Mycol. 2020;72(1):1-17. DOI: 10.33585/cmy.72101

- [35] Piętko J. The development of *Fomitopsis officinalis* mycelium grown on organic media and larch wood under laboratory conditions. *Sylvan*. 2004;9:34-42.
- [36] Motronenko V, Lutsenko T, Galkin A, Gorshunov Y, Solovjova V. Optimization of the culture medium composition to increase the biosynthesis of recombinant human interleukin-7 in *Escherichia coli*. *J Microbiol, Biotechnol Food Sci*. 2020;9(4):761-8. DOI: 10.15414/jmbfs.2020.9.4.761-768
- [37] Fijałkowska A, Krakowska A, Lazur J, Włodarczyk A, Zięba P, Suchanek M, et al. Fortified mycelium of *Fomitopsis officinalis* (Agaricomycetes) as a source of biologically active substances effective in the prevention of civilization diseases. *Int J Med Mushrooms*. 2021;23(9):29-44. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2021039778
- [38] Gromovykh TI, Kovalyeva GK. Biological features and productivity of a new strain of *Fomitopsis officinalis*. *Bull Krasnoyarsk State Agrar University*. 2009;1:68-75.
- [39] Sidorenko ML, Buzoleva LS. Search for new types of raw materials for antibacterial drugs. *Antibiot Khimioter*. 2012;57(5-6):7-10.
- [40] Gromovykh TI, Gavryushina IA, Sadykova VS, Feldman NB, Dmitrenok AS, Ayrapetova AYU, et al. Obtaining immobilized mycelium of basidiomycete *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) bond. et Sing., producer of agaricic acid. *Antibiot Khimioter*. 2018;63(9-10):3-10.
- [41] Mykhaylova OB. Morphological and cultural properties of a medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Basidiomycetes), on nutrient agar media. *Ukr Botan J*. 2014;71(5):603-9. DOI: 10.15407/ukrbotj71.05.603
- [42] Liu X, Zhao M, Wang Q. Biological characteristics of five wood-rotting fungi and wood-decaying ability to *Betula platyphylloides*. *Front For China*. 2009;4(4):508. DOI: 10.1007/s11461-009-0073-8
- [43] Choi DB, Maeng JM, Ding JL, Cha WS. Exopolysaccharide production and mycelial growth in an air-lift bioreactor using *Fomitopsis pinicola*. *J Microbiol Biotechnol*. 2007;17(8):1369-78.
- [44] Mykhaylova OB, Bisko NA, Sukhomlyn MM, Lomborg ML, Pasaylyuk MV, Petrichuk YV, et al. Biological peculiarities of a rare medicinal mushroom *Fomitopsis officinalis* (Fomitopsidaceae, Polyporales) on agar media and plant substrates. *Regulat Mech Biosyst*. 2017;4(8):469-75. DOI: 10.15421/021772

O.B. Mykhaylova¹, N.L. Poyedinok², V.M. Shchetinin³

¹M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

³Wonderbrands Inc., Mississauga, Canada

SCREENING OF STRAINS OF THE MEDICINAL MUSHROOM *FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL.) BONDARTSEV & SINGER PROMISING FOR BIOTECHNOLOGICAL USE

Background. Macromycete cultivation methods development will contribute to the production of biotechnological products based on fungus. Determination of the main factors affecting medicinal macromycetes' life processes allows to control biosynthetic activity of a fungal organism and obtain biotechnological products based on it.

Objective. Screening of *Fomitopsis officinalis* strains promising for biotechnological use, and determining of physico-chemical factors that affect the cultures life processes.

Methods. The objects of the study were three pure cultures of *F. officinalis* (IBK-2497, IBK-2498, IBK-5004). The influence of the acidity of the environment on the growth of mycelium, the needs of the cultures in the sources of carbon and nitrogen nutrition were determined. The following carbon sources were used: monosaccharides (glucose, xylose), disaccharides (sucrose, lactose) and trisaccharides (raffinose), polysaccharides (starch); nitrogen sources: KNO₃, (NH₄)₂HPO₄, asparagine, peptone. Dynamics of the culture growth were determined under the conditions of deep cultivation, on a liquid nutrient medium of glucose-peptone-yeast extract (GPA), g/l: glucose – 30.0; peptone – 3.5; yeast extract – 2.0; KH₂PO₄ – 1.0; K₂HPO₄ – 1.0; MgSO₄·7H₂O – 0.25.

Results. The pH range between 5.5 and 6.0 was the most favorable for active growth of all studied strains of *F. officinalis*. The best carbon sources for growth were glucose and starch; peptone and asparagine were the best source of nitrogen. Nutrient media with xylose, lactose and nitrate nitrogen were least suitable for growth. Analysis of the strains growth dynamics on the GPA medium showed that the largest mass of mycelium (up to 11.54 ± 0.2 g/l) was produced by culture *F. officinalis* IBK-5004 on the 10-th day of cultivation. Cultures *F. officinalis* IBK-2497, IBK-2498 grew slower, and the mycelial mass was 10.33 ± 0.2 and 9.68 ± 0.3 g/l on the 14-th day of cultivation.

Conclusions. Based on the obtained data, the *F. officinalis* IBK-5004 strain was selected. It can be considered a promising mycelial mass producer based on the set of characteristics.

Keywords: *Fomitopsis officinalis*; liquid culture; mycelium mass; nutrient media.