

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ *TRAMETES VERSICOLOR* (POLYPORACEAE) НА СЕРЕДОВИЩАХ, ЩО МІСТЯТЬ ДЕРЕВНІ ЕКСТРАКТИ

П.Р. Зубик*, І.Р. Клечак

КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: pv.zubyk@i.ua

Received 22 February 2023; Accepted 4 April 2023

Проблематика. *Trametes versicolor* – представник базидієвих грибів, біологічно активні сполуки якого застосовуються в медицині та промисловості, тому пошук активних продуцентів, здатних до росту на відходах промисловості, та вивчення нових способів інтенсифікації росту й синтезу метаболітів є актуальним завданням.

Мета. Дослідження впливу екстрактів тирси букоцвітих на ріст, морфологічні характеристики та індукцію синтезу окисних ферментів макроміцетами виду *T. versicolor* у поверхневій культурі.

Методи. Об'єктами досліджень були 5 штамів *T. versicolor*, які культивували на синтетичному агаризованому середовищі Норкранс на чашках Петрі. Вивчався вплив екстрактів тирси 3-х деревних порід, які виступали за основу для дослідних середовищ. Досліджувалися культуральні показники: розмір колонії, швидкість радіального росту, ростовий коефіцієнт; морфологічні характеристики макроміцетів і здатність екстрактів тирси букоцвітих до індукування синтезу окисних ферментів.

Результати. Встановлено, що ріст на середовищах із додаванням екстракту тирси берези інтенсивніший, швидкість радіального росту становить 11,2–13,6 мм/добу, тоді як для буку та дубу коливається в межах 11,6–13,1 та 11,5–12,6 мм/добу відповідно. Найбільше значення росту на всіх середовищах зафіксовано для *T. versicolor* 353. Значення ростового коефіцієнта на середовищі з екстрактами тирси берези варіювало в проміжку 15,8–92,1, буку – 19,4–46,1, дубу – 15,5–46,7 і було найбільшим при культивуванні *T. versicolor* 5299. Екстракти буку та дубу інтенсифікували синтез лаккази, пероксидази і тирозинази, що особливо виражено у *T. versicolor* 353, тому його було вибрано для проведення подальших експериментів у глибинній культурі.

Висновки. Для підвищення накопичення біомаси *T. versicolor* можна використовувати екстракти тирси берези, буку та дубу, а для інтенсифікації синтезу ферментів оксидазного типу – екстракти тирси буку та дубу.

Ключові слова: *Trametes versicolor*; середовище Норкранс; екстракти тирси; *Букоцвіти*; інтенсифікація росту; морфологія; ростовий коефіцієнт; лаккази; пероксидаза; тирозиназа.

Вступ

Базидієві макроміцети – одна з груп грибів, що застосовуються в біотехнології з огляду на їх здатність до росту в культурі. До відділу *Basidiomycota* відноситься майже третина усіх досліджених грибів. Основну частину цього відділу становлять дереворуйнівні гриби [1, 2], які відіграють важливу роль у всіх екосистемах, тому дуже поширені у світі.

Як відомо, плодові тіла грибів містять полісахариди [2], полісахаропептиди і глікопротеїни [3], протеїни [4], терпени та терпеноїди [5], амінокислоти, вітаміни [6], органічні кислоти [7], ліпіди та жирні кислоти [8], феноли [9], мінерали [10] тощо. Ці сполуки обумовлюють високу терапевтичну цінність дереворуйнівних макроміцетів, що відобразилось у багаторічній історії їх використання в народній медицині та

харчуванні в країнах Азії [6], Америки [11], Африки [12] та Європи [13].

Рід *Trametes*, що відноситься до родини *Polyporaceae*, налічує майже 900 видів, які вважаються одними з найпопулярніших і найбільш вивчених макроміцетів із медичними властивостями [14, 15]. Чимало публікацій присвячені дослідженню представників цього роду, зокрема вивченню біологічної дії в лісових екосистемах і промислового застосуванню, що пов'язано із високим потенціалом деструкції деревини [14–22]. Серед всіх представників *Trametes* найпоширенішим є *T. versicolor* (L.) Lloyd, також відомий як *Coriolus versicolor* (L.) Quéf [16]. Основними сполуками, що містяться у міцелії цього гриба і які зумовили його широке застосування, є полісахариди (крестин), полісахаридні пептиди [6, 17], терпеноїди [18], амінокислоти та білки [19]. Екстракти

біомаси проявляють протипухлинні, протиатеросклерозні, антиоксидантні [20], протизапальні, імуностимулювальні, протигенотоксичні [21] та протимікробні властивості [17]. Крім того, *T. versicolor* має потужний комплекс позаклітинних ферментів (лактаза, лігнін пероксидаза, манган пероксидаза тощо) [22], які здійснюють розкладання лігнінцелюлозного матеріалу [21]. Це розширює спектр використання макроміцетів цього та інших видів, зокрема, у виробництві ферментних препаратів, український ринок яких представлений продуктами, які традиційно отримують із використанням мікроміцетів [23].

Ріст грибів і синтез біологічно активних речовин залежать від типу культивування. Розрізняються екстенсивне та інтенсивне культивування, проте перший варіант має обмежене застосування у біотехнології. При інтенсивному культивуванні важливу роль відіграють зовнішні чинники: температура, вихідний рівень рН і склад живильного середовища [24].

Підбір умов культивування часто застосовується в біотехнології макроміцетів для збільшення виходу як біомаси, так і первинних метаболітів [25]. Поверхневе культивування на агаризованих живильних середовищах є важливим етапом скринінгу культур, що дає змогу здійснити вибір найпродуктивніших штамів для подальших досліджень [26]. З цією метою використовуються всі типи середовищ: натуральне, синтетичне та комплексне. Серед натуральних: агаризоване сусло, солодовий екстракт [24], кокосова вода, відвар рисових висівок, відвар кукурудзяної крупи [21]; синтетичних: агаризоване середовище Чапека, Рапера [25], Норкранс [26], Леонінана, Геннерберга, Ліллі, Гопкінса, повне середовище для грибів, глюкозо-пептонний агар [18], знежирене молоко із додаванням глюкози та мінералів [27]; комплексних: картопляно-глюкозний агар [18], середовище Норкранс із додаванням екстракту дубової кори [26] тощо.

При виборі середовищ вирішальним фактором є концентрація вуглецю. Найтипівішими є (у г/дм³): 20, 30 [25], 10, 25, 50 [18], серед яких для *T. versicolor* оптимальними вважаються значення в діапазоні 10–20 г/дм³. Найоптимальнішим джерелом вуглецю є глюкоза. Проте досліджуються й інші моно-, ди- та полісахариди: фруктоза, мальтоза, лактоза, сахароза, ксиліоза, крохмаль, декстрин [18, 28] або їх суміш у випадку пивного сусла (арабіноксилан, β-глюкани, глюкоза, цукроза, мальтоза, маль-

тотріоза, крохмаль/декстрин), солодового екстракту (арабіноксилан, β-глюкани, глюкоза, цукроза, мальтоза, мальтотріоза, фруктоза, крохмаль/декстрин) [29], кокосової води (цукроза, фруктоза, глюкоза тощо) [30], рисових висівок (арабіноза, ксиліоза, глюкоза, галактоза, манноза, рамноза тощо) [31], кукурудзяної крупи (крохмаль, ксиліоза, фруктоза, глюкоза, цукроза) [32], картоплі (крохмаль/декстрин, глюкоза, фруктоза, сахароза) [33].

Дубова кора містить дубильні речовини, феноли, цукри та інші сполуки, які можуть впливати на інтенсивність росту міцелію, тому відвар дубової кори додають до складу живильних середовищ для вирощування макроміцетів. Проте в публікаціях не висвітлюється вплив фенольних сполук на синтез ферментів [26, 34]

Склад живильного середовища також впливає на морфологію макроміцетів, у тому числі *T. versicolor*. Зокрема, натуральні та комплексні середовища інтенсифікують ріст, колонія стає щільнішою та може змінювати колір із віком; додавання екстракту дубової кори збільшує кількість міцелію на середовищі [26]. Існують дані, що ріст на синтетичних середовищах теж може сприяти отриманню щільних білих колоній [25]. Проте інформації щодо впливу екстрактів тирси інших видів дерев на ріст макроміцетів недостатньо.

Таким чином, метою нашої роботи було дослідження впливу екстрактів тирси букоцвітних на ріст, морфологічні характеристики і потенційну здатність до синтезу окисних ферментів макроміцетами виду *T. versicolor* у поверхневій культурі.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були п'ять штамів макроміцетів виду *T. versicolor*, депонованих у Колекції шапінкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України: 353, 1689, 5094, 5095 та 5299 [35].

Для вивчення впливу екстрактів букоцвітних на досліджувані показники макроміцетів було використано тирсу берези, буку та дубу, придбану у місцевого виробника пиломатеріалів.

Отримання екстрактів дерев здійснювалося 20-хвилинним автоклавуванням 50 г тирси розміром 5 × 10 мм у 1 дм³ води за надлишкового тиску 1 атм, після чого фільтруванням відділяли тирсу, а фільтрат використовували для приготування живильних середовищ [36].

Живильні середовища (агаризоване середовище Норкранс, СНА) склалися із: мінеральної основи (10 г/дм³ глюкоза, 1 г/дм³ (NH₄)₂C₄H₄O₆, 1 г/дм³ KН₂PO₄, 0,5 г/дм³ MgSO₄·7H₂O, 0,005 г/дм³ FeC₆H₅O₇·7H₂O, 0,0044 г/дм³ ZnSO₄·7H₂O, 0,055 г/дм³ CaCl₂, 0,04 г/дм³ вітаміну В₁), розчинника (1 дм³ екстракту берези – СНА-Бр / буку – СНА-Бк / дубу – СНА-Д) та 15 г/дм³ агар-агару. Контрольне середовище (СНА-К) було аналогічного складу, проте компоненти розчинялися у воді. Кислотність середовищ доводили до значення $6,8 \pm 0,2$, використовуючи 1 н розчини КОН і НСІ [37].

Культивування об'єктів проводили на чашках Петрі (діаметром 90 мм) за температури 28 ± 1 °С протягом 6 діб. На центр чашки розміщували диск міцелію 7-денної культури, попередньо вирощеної на сусло-агарі [26].

Дослідження культурально-морфологічних характеристик проводили щоденно упродовж усього часу культивування. Вимірювання росту колонії проводили в чотирьох взаємоперпендикулярних напрямках та використовували для побудови кривих росту. Розрахунок швидкості радіального росту проводили за формулою

$$V_R = \frac{R_2 - R_1}{\Delta t},$$

де R – радіус колонії в кінці (R_2) та на початку (R_1) фази лінійного росту, мм; Δt – тривалість фази лінійного росту, діб.

Ростовий коефіцієнт розраховували за формулою

$$PK = \frac{D \cdot H \cdot G}{T},$$

де D – діаметр колонії, мм H – висота колонії, мм; G – щільність колонії, балів, T – вік колонії, діб [38].

В опис морфології колонії входили такі показники: текстура, забарвлення, щільність.

Якісний аналіз на ферменти проводили за допомогою реактивів: α -нафтол – для лаккази, суміші розчинів 1 % пірогалолу та 0,4 % H₂O₂ – пероксидази, п-крезол – тирозинази [37].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою тесту ANOVA. Усі досліди виконували в 3-х повторностях. Статистично достовірними вважали результати зі значеннями p -value < 0,05. Розрахунок усіх показників та побудову графіків, гістограм проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft office Excel (США).

Результати

Інтенсифікація росту грибів з метою збільшення біомаси, зокрема в умовах культивування на агаризованих середовищах, необхідна як для відбору штамів, так і підбору живильних середовищ. Дослідження впливу екстрактів тирси на ріст макроміцетів проводили на агаризованому середовищі Норкранс (СНА), яке містило замість води відповідні екстракти. Було досліджено 4 типи середовищ: СНА на водній основі, СНА на основі екстракту тирси берези, СНА на основі екстракту тирси буку, СНА на основі екстракту тирси дубу. Отримані дані представлені на рис. 1–5.

Згідно з рис. 1, повне обростання чашки Петрі відбулося за 5 діб. Після 2-х діб культивування пришвидшився ріст штаму *T. versicolor* 353 на СНА-К та СНА-Бр. Радіус колонії *T. versicolor* 353 на СНА-К залишався найменшим ($22,6 \pm 1,3$ мм на 3-тю добу та $34,3 \pm 1,4$ мм на 4-ту). Для всіх дослідних середовищ радіус колонії майже не різнився і був у діапазоні 25,0–28,3 мм (після 2-х діб культивування) та 37,4–40,5 мм (після 3-х діб культивування).

У випадку *T. versicolor* 1689 повне обростання чашки Петрі спостерігалось на 6-ту добу досліду (рис. 2). СНА-К зумовлював найбільший радіус тільки та 2-гу добу культивування ($4,5 \pm 0,9$ мм), СНА-Бр – на 4-ту ($24,6 \pm 2,1$ мм), СНА-Д – на 1-шу та 4-ту ($1,1 \pm 0,5$ та $12,9 \pm 1,0$ мм відповідно). На 5-ту добу культивування ріст на контрольному середовищі був найменшим, радіус колонії становив $35,0 \pm 1,1$ мм, тоді як найінтенсивніший ріст спостерігався для СНА-Бр ($39,5 \pm 1,1$ мм).

Для *T. versicolor* 5094 динаміка обростання чашки Петрі на дослідних середовищах порівняно з контрольним була подібною до росту *T. versicolor* 1689 (рис. 3). На 3-тю й 4-ту добу зафіксовано пришвидшення росту на СНА-Бр ($14,0 \pm 1,5$ та $24,5 \pm 1,0$ мм відповідно). На 5-ту добу зафіксовано уповільнення росту на СНА-К ($34,5 \pm 0,9$ мм) і прискорення для дослідних середовищ. Так, на середовищі з додаванням екстракту тирси берези розмір колонії *T. versicolor* 5094 становив $38,8 \pm 0,7$ мм, буку – $39,0 \pm 1,2$ мм, дубу – $38,1 \pm 1,1$ мм.

У випадку культивування *T. versicolor* 5095 спостерігається досягнення максимально можливого радіусу колонії за 6 діб (рис. 4). Через 3 і 4 доби культивування інтенсивніший ріст фіксували на СНА-Бр: $13,9 \pm 1,6$ і $25,6 \pm 1,3$ мм

відповідно, тоді як результати культивування на середовищах, що містили екстракти тирси буку та дубу, були близькі до контрольного й становили 11,6–13,9 мм на 3-тю добу та 21,4–25,1 мм на 4-ту добу експерименту. Після 5 діб культивування найбільший радіус колонії *T. versicolor* 5095 виявили на середовищах, що містять екстракти тирси буку та дубу, – $39,1 \pm 1,6$ і $39,1 \pm 0,8$ мм відповідно. Радіус колонії на середовищі з екстрактом тирси берези дорівнював $37,6 \pm 1,3$ мм. Вирощування на контрольному середовищі дало змогу отримати колонію радіусом $34,9 \pm 1,5$ мм.

Ріст *T. versicolor* 5299 на всіх середовищах має схожу до *T. versicolor* 5095 тенденцію (рис. 5). На 3-тю і 4-ту добу експерименту ріст на середовищі СНА-Бр пришвидшився, а розмір колонії був максимальним і становив відповідно $14,9 \pm 1,2$ і $26,5 \pm 1,2$ мм. У випадку інших живильних середовищ радіуси колонії коливалися в межах 10,6–14,2 мм на 3-тю і 21,7–25,2 мм на 4-ту добу. На 5-ту добу експерименту зафіксовано мінімальний розмір колонії *T. versicolor* 5299 ($33,6 \pm 1,0$ мм) при культивуванні на СНА-К, а радіус на дослідних середовищах коливався в межах 37,2–39,9 мм. Уже на 6-ту добу спостері-

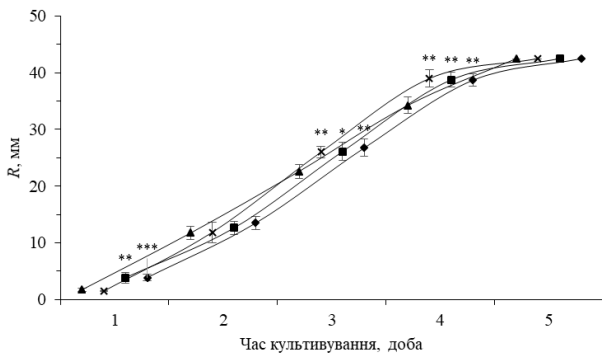


Рисунок 1: Динаміка росту *T. versicolor* 353

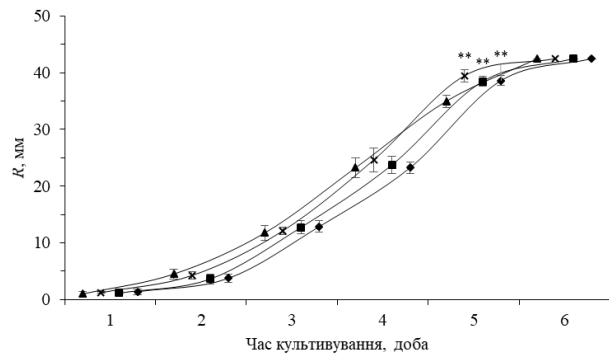


Рисунок 2: Динаміка росту *T. versicolor* 1689

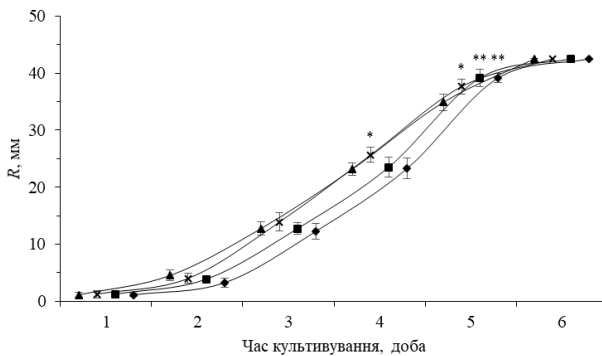


Рисунок 3: Динаміка росту *T. versicolor* 5094

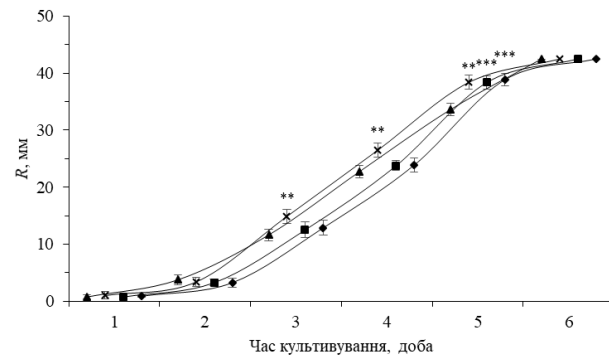


Рисунок 4: Динаміка росту *T. versicolor* 5095

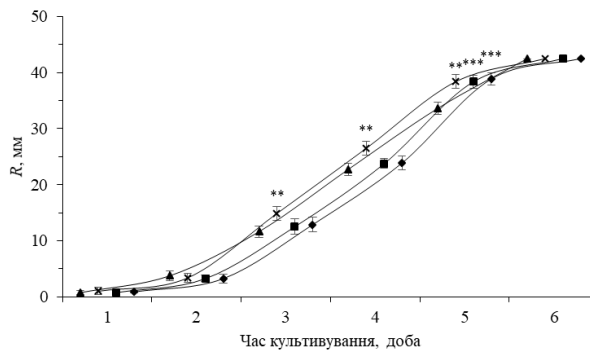


Рисунок 5: Динаміка росту *T. versicolor* 5299

Примітки. —▲— СНА-К, —×— СНА-Бр, —■— СНА-Бк, —◆— СНА-Д; * – *p*-value < 0,05, ** – *p*-value < 0,01, *** – *p*-value < 0,001

гали обростання всієї площі чашки Петрі для всіх типів СНА.

На основі графіків на рис. 1–5 було розраховано швидкість радіального росту та ростовий коефіцієнт досліджуваних штамів з урахуванням того, що експоненційний ріст тривав з 2-ї по 5-ту добу культивування (з 2-ї по 4-ту для *T. versicolor* 353). Результати представлені на рис. 6–8.

Згідно з рис. 6, на контрольному середовищі спостерігаються найнижчі показники швидкості. Проте найактивнішим виявився

T. versicolor 353, швидкість росту якого становить $11,3 \pm 0,4$ мм/добу. Ріст *T. versicolor* 353 на СНА-Бр – найшвидкіший (відносно СНА-К та СНА-Д для цього штаму, $p < 0,05$), про що свідчить найбільше значення швидкості росту – $13,6 \pm 0,2$ мм/добу. Швидкості радіального росту інших досліджуваних штамів *T. versicolor* на дослідних середовищах статистично не відрізнялися між собою.

Величина ростового коефіцієнта залежить від типу середовища та штаму *T. versicolor*. Проте вирощування на СНА-Бр приводило до

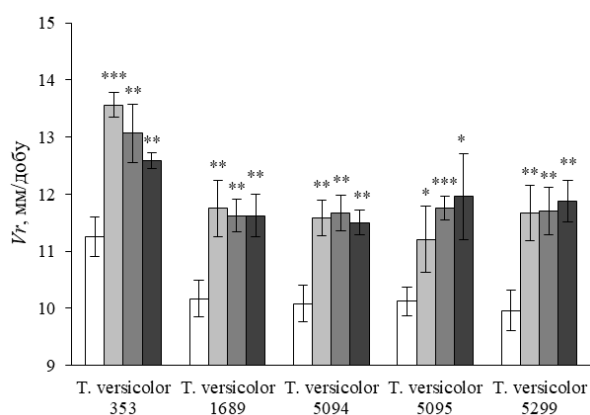


Рисунок 6: Швидкість радіального росту штамів *T. versicolor*

Примітки. □ – СНА-К □ – СНА-Бр, ■ – СНА-Бк, ■ – СНА-Д; * – p -value < 0,05, ** – p -value < 0,01, *** – p -value < 0,001

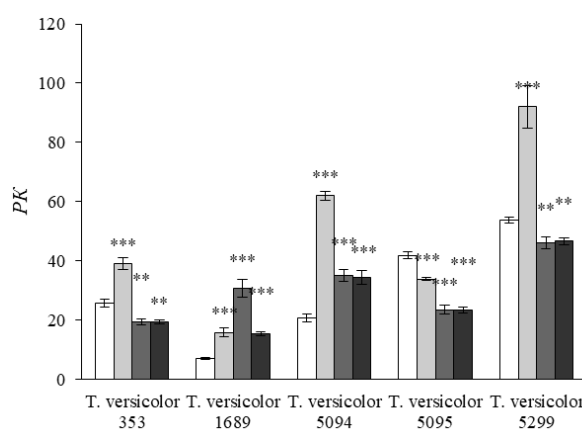


Рисунок 7: Ростовий коефіцієнт штамів *T. versicolor*

T. versicolor 353 *T. versicolor* 1689 *T. versicolor* 5094 *T. versicolor* 5095 *T. versicolor* 5299

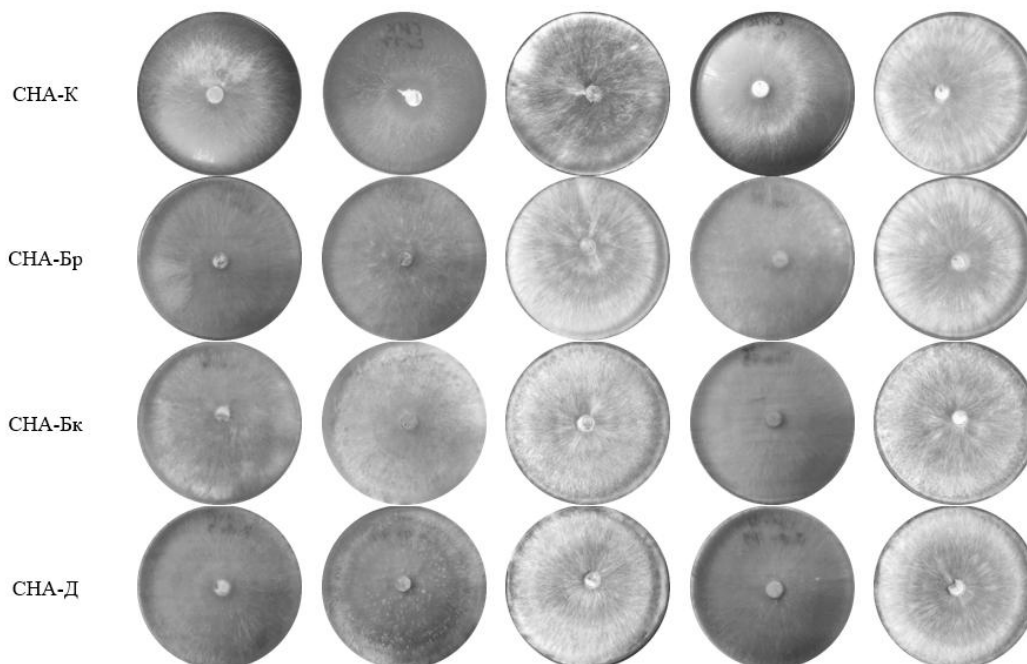


Рисунок 8: Морфологія штамів *T. versicolor* на дослідних середовищах

Таблиця: Оксидазна активність штамів *T. versicolor*

Об'єкт дослідження	Лакказа				Пероксидаза				Тирозиназа			
	СНА-К	СНА-Бр	СНА-Бк	СНА-Д	СНА-К	СНА-Бр	СНА-Бк	СНА-Д	СНА-К	СНА-Бр	СНА-Бк	СНА-Д
<i>T. versicolor</i> 353	1	2	3	3	0	0	1	1	1	1	2	2
<i>T. versicolor</i> 1689	1	2	3	3	0	0	1	2	1	0	2	2
<i>T. versicolor</i> 5094	1	1	2	3	0	0	1	1	0	0	1	2
<i>T. versicolor</i> 5095	1	2	3	3	0	0	1	2	0	0	2	2
<i>T. versicolor</i> 5299	1	1	2	3	0	0	1	1	0	0	0	2

Примітка. 0 – реакція відсутня, 1 – реакція слабо виражена, 2 – реакція помірно виражена, 3 – реакція сильно виражена.

отримання більших значень цього показника для всіх штамів, крім *T. versicolor* 5095 (рис. 7). Ростовий коефіцієнт на контрольному середовищі був у межах від 7 (для *T. versicolor* 1689) до 53,8 (для *T. versicolor* 5299). При додаванні екстрактів тирси буку та дубу спостерігалися значення коефіцієнта для штамів *T. versicolor* 353, *T. versicolor* 5094, *T. versicolor* 5095 і *T. versicolor* 5299, які достовірно не відрізнялися між собою. Проте спостерігалися штамові відмінності відносно контрольних значень, які становили відповідно $25,7 \pm 1,4$; $20,7 \pm 1,2$; $41,9 \pm 1,1$ та $53,8 \pm 1,1$.

Ростовий коефіцієнт значною мірою залежить від морфології макроміцетів. Відповідно, більші значення цього показника характерні для колоній зі щільнішим і вищим міцелієм. Морфологія залежить від складу живильного середовища та умов культивування і може бути критерієм придатності середовища для росту біомаси та біосинтезу метаболітів в умовах штучної культури.

У процесі культивування на живильному середовищі з екстрактом тирси берези формувались щільні міцеліальні колонії (2–4 бали) висотою від 1,5 до 3 мм (рис. 8). Ріст *T. versicolor* 353 супроводжувався утворенням нещільних колоній (1-2 бали); наявна радіальна зональність, яка особливо помітна на СНА-Д. Штам *T. versicolor* 1689 на контрольному середовищі формувал низькі (0,5–1 мм) і прозорі міцеліальні колонії (1 бал). У випадку росту на СНА-Бк фіксується утворення щільнішого (2 бали) та вищого на 1 мм) міцелію у пристінкових зонах. Колонія *T. versicolor* 5094 на всіх типах середовищ мала чітко виражену зональність, проте щільність міцелію на середовищах із додаванням екстрактів тирси була вищою, ніж на контрольному (на 2-3 бали); на СНА-Д також спостерігається більша висота

колонії біля стінок чашки Петрі (на 1-2 мм). Штам *T. versicolor* 5095 на СНА-К формувал щільніші ватні колонії навколо інокулюму (2 бали), тоді як в інших випадках міцелій був прозорішим (1 бал). Культивування *T. versicolor* 5299 на агаризованих середовищах дало змогу отримати колонії з найбільшою щільністю гіфів (3-4 бали), проте додавання екстракту буку та дубу супроводжувалося виникненням вищого міцелію ближче до стінок чашки Петрі (на 1-1,5 мм).

Після вивчення морфології для визначення впливу екстрактів тирси деревних порід на індукування окисних ферментів на край колонії наносили краплю реактиву для якісного визначення ферментативної активності (таблиця).

Відповідно до даних таблиці, на середовищах із додаванням екстрактів тирси буку та дубу якісні реакції на лакказу мали найінтенсивніший прояв, що може бути пов'язано з її високим вмістом у середовищі. Пероксидазна і тирозиназна активність проявлялися з меншою інтенсивністю, тоді як контрольне середовище та середовище з додаванням екстракту тирси берези не індукували продукування цих оксидаз.

Обговорення

Дереворуйнівні макроміцети, зокрема *T. versicolor*, у природних умовах ростуть на листяних деревах (березі, буці, вербі, дубі тощо), іноді трапляються на хвойних (модрині, ялині, сосні) [39, 40]. Зазвичай дослідники відштовхуються від природних субстратів і для отримання плодівих тіл чи ферментів *T. versicolor* культивують на дубовій, буковій, грабовій, березовій чи іншій тирсі, до якої можуть додавати мінеральні компоненти для підвищення виходу цільового продукту [41–43]. Екстракти тирси дерев, отримані з використанням різних підхо-

дів, містять в основному гексози, пентози, моно- та поліфенольні сполуки, мінерали тощо. Кількісно-якісний склад залежить від способу екстракції, але чіткої кореляції між показниками не спостерігається [44]. Водночас загальна кількість речовин, що екстрагуються за гарячої водної екстракції, майже на 40 % більша порівняно з холодною водною [45]. Тому в нашому дослідженні ми використовуємо екстракти тирси берези, буку та дубу, отримані за допомогою екстрагування стружки за 121 °С упродовж 20 хв.

Культивування штамів *T. versicolor* на агаризованих середовищах Норкранс із використанням водних екстрактів тирси букоцвітих зумовлює вищі показники радіального росту, в деяких випадках щільніші колонії, та індукує синтез окисних ферментів порівняно із живильним середовищем на основі води. Біохімічні механізми стимуляції росту макроміцетів у відповідь на наявність водних екстрактів тирси деревини складні та малодосліджені. Проте різні компоненти екстракту можуть інтенсифікувати ріст культури [46] або синтез ферментів [47]. Швидкість росту штамів *T. versicolor* на контрольному середовищі Норкранс дорівнювала 10,0–11,3 мм/добу. Базидіоцити з такими показниками відносять до умовно швидкорослих. Екстракти тирси інтенсифікують ріст, у результаті чого *T. versicolor* 353 може бути віднесений до швидкорослих штамів (швидкість радіального росту – 12,6–13,6 м/добу), інші досліджувані штами дуже близькі до цих значень, особливо при рості на екстрактах тирси берези. Найближчими за значеннями швидкості росту до отриманих нами результатів можна вважати штами *Plerotus ostreatus* (9,5–11,6 мм/добу), *P. salignus* (10,1–11,0 мм/добу), *Schizophyllum commune* (11,2–11,4 мм/добу), *Volvariella volvaceae* (11,3–12,7 мм/добу) при культивуванні на пшеничному та вівсяному агарі [48].

Ріст *T. versicolor* на середовищах різного складу досліджувався в роботі [26]. Значення змінювалися залежно від штаму та живильного середовища. Найбільша швидкість росту серед усіх штамів спостерігалася для *T. versicolor* 5095 і становила $15,0 \pm 0,1$ мм/добу при рості на агаризованому пивному суслі (СА). Додавання відвару дубової кори до СА в кількості 5 % від об'єму середовища зменшувала швидкість росту всіх досліджуваних штамів, крім *T. versicolor* 353, де спостерігалася збільшення росту на 6,3 %. У проведеному нами дослідженні ріст цього штаму на середовищі Норкранс із дода-

ванням екстракту тирси дубу становив $12,6 \pm 0,2$ мм/добу, що у 1,2 разу більше від контрольного значення. Відмінності у впливі екстрактів тирси дерев на ріст макроміцетів можуть бути пояснені тим, що дубова кора та її відвар, на відміну від екстракту тирси, містили більшу кількість фенольних та інших класів сполук, які інгібували ріст міцелію.

Nguyen та ін. досліджували ріст *T. versicolor* на синтетичних і комплексних середовищах за різних температур. Встановлено, що найінтенсивніший ріст спостерігався за 30 °С, а колонії були білими і ватними. Радіус міцелію на агаризованому картопляно-глюкозному середовищі та його модифікації становив $42,0 \pm 0,6$ мм для *T. versicolor* VNUA і $42,7 \pm 0,5$ мм для *T. versicolor* BV на 6-ту добу культивування. Автори повідомляють, що ріст на синтетичному середовищі Чапека приводить до формування міцелію середньої щільності, тоді як високу щільність отримували на комплексних середовищах [25]. У нашому дослідженні для всіх штамів спостерігались аналогічні дані – 42,5 мм, а для *T. versicolor* 353 таке значення отримували на 5-ту добу. Спостерігалась варіабельність у формуванні міцелію на середовищі Норкранс для різних штамів, а ріст на середовищах із додаванням екстрактів тирси дерев підвищував його щільність на чашці Петрі. Такі результати можуть бути пов'язані як із різним складом середовища, так і з генетичними особливостями штаму. Koutroutsios і Zervakis [49] вивчали ріст *T. versicolor* на агаризованих стічних водах млина оливкової олії (СВМОО), які містять, зокрема, фенольні сполуки. Встановлено, що радіус колонії коливався в межах 3,3–3,7 мм (за концентрації 100 % СВМОО), 4,1–4,4 мм (за концентрації 50 % СВМОО) та 4,4–5,6 мм (за концентрації 25 % СВМОО). Тобто збільшення концентрації СВМОО негативно впливало на ріст штамів, але фенольні сполуки, наявні у складі СВМОО, інтенсифікували синтез лаккази і пероксидаз. Проте дослідники не використовували додаткові джерела хімічних елементів. Ми ж досліджували ріст штамів на типових середовищах певного складу, додаючи екстракти тирси, що супроводжувалося інтенсифікацією росту всіх досліджуваних штамів та індукцією синтезу ферментів оксидазного типу.

Колонія *T. versicolor* при культивуванні на синтетичному середовищі, що містить глюкозу, пептон, дріжджовий екстракт, лимонну кислоту, натрій гідрофосфат і магній сульфат гепта-

гідрат, була дуже щільною та зональною [50], тоді як у нашому експерименті колонії набували таких якісних показників при культивуванні на середовищах із додаванням екстрактів тирси.

У роботі Жо зі співавт. [18] культивування *T. versicolor* на природних і комплексних середовищах приводило до отримання максимальних значень радіуса колонії на 4-ту добу експерименту – від 57,5 до 67,8 мм, тоді як синтетичні середовища зумовлювали менш інтенсивний ріст і більші варіації значень (залежно від штаму): 10,2–67,8 мм. Зміна якісного складу живильного середовища за рахунок варіації джерел вуглецю, азоту, мінералів тощо інтенсифікувала ріст і сприяла формуванню щільнішого міцелію. У наших дослідженнях спостерігалися аналогічні дані при додаванні екстрактів тирси деревини. Діаметр колонії при вирощуванні на синтетичному середовищі Норкранс становив 43,6–73,5 мм на 4-ту добу, а при додаванні деревних екстрактів збільшувався до 48,4–85,2 мм. Це може бути пов'язано із наявністю аналогічних сполук у складі екстрактів, що інтенсифікують ріст.

Висновки

Наявність екстрактів тирси букоцвітих у живильному середовищі збільшує швидкість радіального росту макроміцетів, зокрема шта-

мів *T. versicolor*, порівняно із використанням аналогічних середовищ на основі води. Встановлено, що склад середовища достовірно впливав на всі досліджувані показники (радіус колонії у визначений день росту, швидкість радіального росту, ростовий коефіцієнт) у всіх штамів, що були відібрані для експерименту. Зміна щільності та висоти міцелію впливали на значення ростового коефіцієнта. Крім того, екстракти тирси дерев інтенсифікували синтез ферментів-оксидаз. Найбільш вираженою реакцією була при додаванні екстракту буку та дубу під час визначення лакказної активності у всіх досліджуваних штамів. Таким чином, для підвищення накопичення біомаси *T. versicolor* можна використовувати екстракти тирси берези, буку та дубу, а для індукції ферментів оксидазного типу – екстракти тирси буку та дубу. За результатами дослідження інтенсивності росту на індукції синтезу ферментів штам *T. versicolor* 353 було вибрано для подальших досліджень. Результати цього дослідження можуть бути використані для вивчення впливу екстрактів промислових відходів на ріст і біосинтетичну активність макроміцетів у глибинній культурі.

Розкриття інтересів

Автори не заявляють про наявність конфлікту інтересів до розкриття.

References

- [1] Sergeantani AG, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Hatzinikolaou DG. Lignocellulose degradation potential of *Basidiomycota* from Thrace (NE Greece). *Int Biodeterior Biodegradation*. 2016;114:268-77. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.07.004
- [2] Zhang BB, Guan YY, Hu PF, Chen L, Xu GR, Liu L, et al. Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: recent advances and future development. *Crit Rev Biotechnol*. 2019;39(4):541-54. DOI: 10.1080/07388551.2019.1577798
- [3] Dudekula UT, Doriya K, Devarai SK. A critical review on submerged production of mushroom and their bioactive metabolites. *3 Biotech*. 2020;10(8):337. DOI: 10.1007/s13205-020-02333-y
- [4] Li QZ, Zheng YZ, Zhou XW. Fungal immunomodulatory proteins: characteristic, potential antitumor activities and their molecular mechanisms. *Drug Discov Today*. 2019;24(1):307-14. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.09.014
- [5] Hsu KD, Wu SP, Lin SP, Lum CC, Cheng KC. Enhanced active extracellular polysaccharide production from *Ganoderma formosanum* using computational modeling. *J Food Drug Anal*. 2017;25(4):804-11. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.12.006
- [6] Varghese R, Dalvi YB, Lamrood PY, Shinde BP, Nair CKK. Historical and current perspectives on therapeutic potential of higher basidiomycetes: an overview. *3 Biotech*. 2019;9:362. DOI: 10.1007/s13205-019-1886-2
- [7] Sandargo B, Chepkirui C, Cheng T, Chaverra-Muñoz L, Thongbai B, Stadler M, et al. Biological and chemical diversity go hand in hand: *Basidiomycota* as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Biotechnol Adv*. 2019;37(6):107344. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.011
- [8] Pilafidis S, Diamantopoulou P, Gkatzionis K, Sarris D. Valorization of agro-industrial wastes and residues through the production of bioactive compounds by macrofungi in liquid state cultures: growing circular economy. *Appl Sci*. 2022;12(22):11426. DOI: 10.3390/app122211426
- [9] Cateni F, Gargano ML, Procida G, Venturella G, Cirilincione F, Ferraro V. Mycochemicals in wild and cultivated mushrooms: nutrition and health. *Phytochem Rev*. 2022;21(2):339-83. DOI: 10.1007/s11101-021-09748-2

- [10] Yadav D, Negi PS. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Res Int.* 2021;148:110599. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110599
- [11] Fabros J, Dulay R, De Leon A, Kalaw S, Reyes R. Distribution, cultivation, nutritional composition, and bioactivities of *Lentinus* (*Polyporaceae*, *Basidiomycetes*): A review. *Curr Res Environ Appl Mycol.* 2022;12(1):170-219. DOI: 10.5943/cream/12/1/13
- [12] Liu D, Chen YQ, Xiao XW, Zhong RT, Yang CF, Liu B, et al. Nutrient properties and nuclear magnetic resonance-based metabonomic analysis of macrofungi. *Foods.* 2019;8(9):397. DOI: 10.3390/foods8090397
- [13] Yap HYY, Ariffen Rosli MF, Tan SH, Kong BH, Fung SY. The wound healing potential of *Lignosus rhinocerus* and other ethno-mycology wound healing agents. *Mycobiology.* 2023;51(1):1-15. DOI: 10.1080/12298093.2022.2164641
- [14] Hapuarachchi KK, Karunarathna SC, Xu XH, Dutta AK, Phengsintham P, Hyde KD, et al. A review on bioactive compounds, beneficial properties and biotechnological approaches of *Trametes* (*Polyporaceae*, *Polyporales*) and a new record from Laos. *Chiang Mai J Sci.* 2021;48(3):674-98.
- [15] Veena SS, Pandey M. Physiological and cultivation requirements of *Trametes versicolor*, a medicinal mushroom to diversify Indian mushroom industry. *Indian J Agric Sci.* 2012;82(8):672-5.
- [16] Habtemariam S. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: targets and efficacy. *Biomedicines.* 2020;8(5):135. DOI: 10.3390/biomedicines8050135
- [17] Hernández Mendieta E, Ramos MA, Miranda AS, Granados CR. Evaluation of crude extracts of *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát to control of phytopathogenic fungi. *Int J Plant Res.* 2019;9:8-13. DOI: 10.5923/j.plant.20190901.02
- [18] Jo WS, Kang MJ, Choi SY, Yoo YB, Seok SJ, Jung HY. Culture conditions for mycelial growth of *Coriolus versicolor*. *Mycobiology.* 2010;38(3):195. DOI: 10.4489/MYCO.2010.38.3.195
- [19] Elkhateeb WA, Elnahas MO, Thomas PW, Daba GM. *Trametes Versicolor* and *Dictyophora Indusiata* champions of Medicinal mushrooms. *Open Access J Pharm Res.* 2020;4(1). DOI: 10.23880/OAJPR-16000192
- [20] Meng F, Lin Y, Hu L, Feng W, Su P, Wu L. The therapeutic effect of *Coriolus versicolor* fruiting body on STZ-induced ICR diabetic mice. *J Healthc Eng.* 2022;2022:1-9. DOI: 10.1155/2022/7282453
- [21] Dulay RMR, Alcazar AA, Kalaw SP, Reyes RG, Cabrera EC. Nutritional and physical requirements for mycelial growth and basidiocarp production of *Trametes elegans* from the Philippines. *Asian J Agric Biol.* 2021;2021(1). DOI: 10.35495/ajab.2020.06.339
- [22] Rameshaiah GN, Jagadish Reddy ML. Applications of ligninolytic enzymes from a white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Univers J Environ Res Technol.* 2015;5(1):1-7.
- [23] Enzim. Plant of microbiological synthesis preparations manufacture [Internet]. Enzim. 2023 [cited 2023 Feb 15]. Available from: <https://enzim.ua/index.php>
- [24] Sagar S, Thakur M, Sharma I, Tripathi A. Optimization of mycelia growth parameters for Wild white rot fungi *Trametes elegans* and *Trametes versicolor*. *Asia Life Sci.* 2020;12:5-14.
- [25] Nguyen BTT, Le VV, Nguyen HTT, Nguyen LT, Dong TA, Xuan NN. Successful rescue of wild *Trametes versicolor* strains using sawdust and rice husk-based substrate. *Pak J Biol Sci.* 2021;24(3):374-82. DOI: 10.3923/pjbs.2021.374.382
- [26] Klechak IR, Bisko NA, Poyedinok NL, Antonenko LO. The growth mechanisms of the promising research subjects of biotechnology-basidiomycetes mushrooms of the genus *Coriolus* on agar mediums. *Naukovi Visti NTUU KPI.* 2008;6:100-7.
- [27] Vishvakarma R, Vimal A, Mishra A, Sharma P, Gaur VK. *Trametes versicolor* (L.) Lloyd as a source of thermostable serine protease: production and characterization. *Indian J Exp Biol.* 2022;60(9). DOI: 10.56042/ijeb.v60i09.65147
- [28] Nguyen BTT, Le VV, Nguyen HTT, Nguyen LT, Tran TTT, Ngo NX. Nutritional requirements for the enhanced mycelial growth and yield performance of *Trametes versicolor*. *J Appl Biol Biotechnol.* 2021;9(1):1-17. DOI: 10.7324/JABB.2021.9101
- [29] Langenaeken NA, De Schepper CF, De Schutter DP, Courtin CM. Carbohydrate content and structure during malting and brewing: a mass balance study. *J Inst Brew.* 2020;126(3):253-62. DOI: 10.1002/jib.619
- [30] Intan Kailaku S, Nur Alam Syah A, Risfaheri R, Setiawan B, Sulaeman A. Carbohydrate-electrolyte characteristics of coconut water from different varieties and its potential as natural isotonic drink. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol.* 2015;5(3):174. DOI: 10.18517/ijaseit.5.3.515
- [31] Saunders RM. Rice bran: Composition and potential food uses. *Food Rev Int.* 1985;1(3):465-95. DOI: 10.1080/87559128509540780
- [32] Zilic S, Milasinovic M, Terzic D, Barac M, Ignjatovic-Micic D. Grain characteristics and composition of maize specialty hybrids. *Spanish J Agric Res.* 2011;9(1):230. DOI: 10.5424/sjar/20110901-053-10
- [33] Bondarchuk AA, Vermenko YY, Furdyha MM. Consumer quality of potato varieties selected by the Institute for Potato Research of the National Academy of Agrarian Sciences. *Kartoplyarstvo.* 2016;43:94-110.
- [34] Ivanova T. Effects of membranotropic microfertilizers to grow the mycelium of *Lentinula edodes*. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2019;9(3):605-9. DOI: 10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.605-609
- [35] Bisko N, Lomberg M, Mykchaylova O, Mytropolska N. IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.2. The IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany [Data file]. M.G. Kholodny Institute of Botany; 2020 [cited 2023 Feb 15]. Available from: <https://doi.org/10.15468/dzdsqu>

- [36] Plotnikov EV, Glukhova LB, Sokolyanskaya LO, Karmachuk OV, Solioz M. Effect of tree species on enzyme secretion by the shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*. 2016;18(7):637-44. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i7.90
- [37] Bukhalo AS. Higher edible basidiomycetes in pure culture. Kyiv: Naukova Dumka; 1988. 144 p.
- [38] Dzigun LP. Features of the wood-destroying basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill in culture. *Ukr Bot J*. 2004;61(1):100-5.
- [39] Günther A, Schulze ED, Purahong W, Gminder A, Tanunchai B, Schneider H, et al. Biodiversity and conservation of Basidiomycetes: The importance of urban areas and associated. *Artenschutz Rep*. 2022;46:1–11.
- [40] Gautam AK. Notes on wood rotting fungi from India (1): *Trametes versicolor* - The Turkey Tail. *J New Biol Reports*. 2013;2(2):67-70.
- [41] Montoya S, Patiño A, Sánchez ÓJ. Production of lignocellulolytic enzymes and biomass of *Trametes versicolor* from agro-industrial residues in a novel fixed-bed bioreactor with natural convection and forced aeration at pilot scale. *Processes*. 2021;9(2):397. DOI: 10.3390/pr9020397
- [42] Schrit H, Vidi S, Pleissner D. Spent mushroom substrate and sawdust to produce mycelium-based thermal insulation composites. *J Clean Prod*. 2021;313:127910. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.127910
- [43] Irbe I, Loris GD, Filipova I, Andze L, Skute M. Characterization of self-growing biomaterials made of fungal mycelium and various lignocellulose-containing ingredients. *Materials (Basel)*. 2022;15(21):7608. DOI: 10.3390/ma15217608
- [44] Miasek K, Remacle C, Richel A, Goffin D. Beech wood *Fagus sylvatica* dilute-acid hydrolysate as a feedstock to support *Chlorella sorokiniana* biomass, fatty acid and pigment production. *Bioresour Technol*. 2017;230:122-31. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.01.034
- [45] Chauhan K, Sharma KR, Dutt B. Variation in hot and cold water soluble extractive content in gymnosperms from Western Himalayas. *J Pharmacogn Phytochem*. 2020;9(5):1151-4. DOI: 10.22271/phyto.2020.v9.i5p.12383
- [46] Enman J, Hodge D, Berglund KA, Rova U. Growth promotive conditions for enhanced eritadenine production during submerged cultivation of *Lentinus edodes*. *J Chem Technol Biotechnol*. 2012;87(7):903-7. DOI: 10.1002/jctb.3697
- [47] Tanesaka E, Takeda H, Yoshida M. Phenol-oxidizing enzyme expression in *Lentinula edodes* by the addition of sawdust extract, aromatic compounds, or copper in liquid culture media. *Biocontrol Sci*. 2013;18(3):143-9. DOI: 10.4265/bio.18.143
- [48] Lomberg ML, Solomko EF. Growth of macromycetes cultures on agarized nutrient media and dense substrates. In: Vasser S, editor. *Biological properties of medicinal macromycetes in a culture*. Kyiv: Altpres; 2012. p. 345-71.
- [49] Koutrotsios G, Zervakis GI. Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macrofungi. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-14. DOI: 10.1155/2014/482937
- [50] Velásquez-Riaño M, Carvajal-Arias CE, Rojas-Prieto NL, Ausecha-García SA, Vera-Díaz MÁ, Meneses-Sánchez JS, et al. Evaluation of a mixed simultaneous vinasse degradation treatment using *Komagataeibacter kakiaceti* GM5 and *Trametes versicolor* DSM 3086. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;164:425-33. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.037

P.R. Zubyk, I.R. Klechak

Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

CULTURAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF *TRAMETES VERSICOLOR* (POLYPORACEAE) GROWTH ON WOOD HYDROLYZES CONTAINING MEDIA

Background. *Trametes versicolor* is a representative of basidiomycota, whose biologically active compounds are used in medicine and industry, so the search for active producers capable of growing on industrial waste and the study of new ways of intensification of growth and synthesis of metabolites are relevant task.

Objective. Investigation of the effect of *Fagales* sawdust extracts on growth, morphological characteristics, and induction of synthesis of oxidizing enzymes by macromycetes of the species *T. versicolor* in surface culture.

Methods. The objects of research were 5 strains of *T. versicolor*, which were cultivated on the synthetic agarized Norcrans media on Petri dishes. The influence of the sawdust extracts of 3 tree species, which acted as a basis for research media, was studied. The following cultural indicators were investigated: colony size, radial growth rate, and growth rate. The research also covered the study of macromycetes' morphological characteristics and the ability of *Fagales* sawdust extracts to induce the synthesis of oxidative enzymes.

Results. It is established that growth on media with the addition of birch extract is more intense: the radial growth rate is 11.2–13.6 mm/day, while for beech and oak, the growth rate ranges from 11.6–13.1 and 11.5–12.6 mm/day respectively. The highest growth value on all media is recorded for *T. versicolor* 353. The value of the growth rate on the medium with birch sawdust extracts varied in the range 15.8–92.1, for medium with beech extracts – 19.4–46.1, with oak extracts – 15.5–46.7, and the highest growth value was recorded during the cultivation of *T. versicolor* 5299. The beech and oak sawdust extracts intensified the synthesis of laccase, peroxidase, and tyrosinase, which was strongly expressed in *T. versicolor* 353, so it was chosen for further experiments with submerged cultivation.

Conclusions. Birch, beech, and oak sawdust extracts can be used to increase the accumulation of *T. versicolor* biomass while beech and oak sawdust extracts are preferable for the intensification of the synthesis of oxidase-type enzymes.

Keywords: *Trametes versicolor*; Norcrans medium; sawdust extract; *Fagales*; growth intensification; morphology; growth rate; laccase; peroxidase; tyrosinase.