

УДК 582.284: 57.083.1

## МЕТОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МАКРОМИЦЕТОВ

© 2023 г. Н. С. Комиссаров<sup>1,\*</sup>, М. Ю. Дьяков<sup>1,\*\*</sup>, Л. В. Гарибова<sup>1,\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

\*e-mail: macoloams@gmail.com

\*\*e-mail: max\_fungi@mail.ru

\*\*\*e-mail: gariblv@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.10.2022 г.

После доработки 05.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Базидиальные макромицеты обладают значительным биотехнологическим потенциалом и являются перспективными объектами для использования в различных промышленных отраслях, таких как пищевое производство, фармацевтика, производство активных соединений и полисахаридов. Промышленное применение макромицетов подразумевает наличие крупных коллекций культур, использующих протоколы хранения, обеспечивающие сохранение жизнеспособности, репродуктивности, генетическую стабильность и способность продуцировать активные соединения. С расширением списка используемых видов целесообразным является разработка новых протоколов хранения штаммов и оптимизация имеющихся под новые, перспективные виды макромицетов. Необходимым представляется подробное изучение влияния длительных периодов хранения на морфолого-культуральные характеристики, генетическую стабильность, ферментативную активность и способность формировать половые структуры.

**Ключевые слова:** базидиомицеты, криопротектор, криохранение, лиофилизация, макромицеты

**DOI:** 10.31857/S0026364823030054, **EDN:** VCLMPC

### ВВЕДЕНИЕ

Макромицеты – представители группы грибов, формирующих плодовые тела, которые можно различить невооруженным глазом, а также дать их первичное описание и приблизительную таксономическую принадлежность, не используя оптические инструменты. Это сборная группа, включающая в себя представителей отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* (Wessels, 1993; Lodge et al., 2004; Mueller et al., 2007). Изучение аспектов физиологии, биохимии и морфологии макромицетов подразумевает наличие рабочих, поддерживаемых в жизнеспособном состоянии коллекций штаммов различных видов, которые должны не только оставаться жизнеспособными после длительных периодов хранения, но и сохранять репродуктивную способность, морфолого-культуральные и биохимические свойства (скорость роста, морфология, продукция метаболитов и т.д.). Это относится не только к учебным и научным коллекциям, коллекциям на пищевых и биотехнологических производствах, но и к проектам по сохранению штаммов видов, находящихся под угрозой исчезновения. Использование макромицетов в хозяйственной деятельности представляет собой уникальный по своей структуре и сложности произ-

водственный комплекс, основой которого является поддерживаемая и регулярно обновляемая коллекция штаммов. В связи с этим необходимым представляются оценка эффективности применяемых методов хранения в сохранении жизнеспособности, физиологических и биохимических свойств штаммов, разработка новых протоколов хранения и адаптация имеющихся под новые группы видов (Smith, 1998; Nakasone et al., 2004; Singh et al., 2004a; Bisko et al., 2018; Linde et al., 2018).

### СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ МАКРОМИЦЕТОВ

Плодовые тела макромицетов являются богатым источником микро- и макроэлементов, протеинов и углеводов при низком содержании жиров, с чем связано их широкое применение в пищевой промышленности (Ahlawat et al., 2016; Vetter, 2019). Плодовые тела культивируемых макромицетов богаты минеральными соединениями, в частности, калием, фосфором, железом, цинком, медью и селеном. Особенно высоко содержание витамина B<sub>1</sub>, рибофлавина (витамин B<sub>2</sub>), ниацина (витамин PP) и производных фолиевой кислоты, находящиеся на уровне свежих овощей, яиц

и сыра (Mattila et al., 2001; Furlani, Godoy, 2008). Содержание микроэлементов в спорокарпах промышленно выращиваемых макромицетов сильно отличается, в зависимости от видовой принадлежности. Концентрация селена в плодовых телах *Pleurotus ostreatus* и *Lentinula edodes* ниже в 20 и 80 раз, соответственно, чем у *Agaricus bisporus*, при более высоком содержании Zn (Furlani, Godoy, 2008).

К наиболее распространенным видам культивируемых макромицетов, составляющим 82% от общего объема выращенных плодовых тел, относятся штаммы следующих видов: *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae*, *Cyclocybe cylindracea*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* (Chang, 1999; Rai, 2004; Vetter, 2019). По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН на август 2019 г., объем мирового производства плодовых тел макромицетов составил 20.85 млн метрических тонн. Лидером в культивировании макромицетов является Китай (Rai, 2004; Atila, 2017), в 2019 г. производивший 86% от общего объема выращенных плодовых тел в мире (FAO, 2019).

Макромицеты обладают значительным потенциалом для использования в фармацевтической промышленности, производстве активных соединений, применяемых в лечебной практике. Например, плодовые тела штаммов вида *Agaricus bisporus* являются источником незаменимых, условно незаменимых и заменимых аминокислот, в частности, аргинина, используемого в ряде пищевых добавок, применяемых в рационе больных онкологическими заболеваниями (Kalač, 2012; Muszyńska et al., 2017; Jahani et al., 2018). Аминокислотный состав белков *A. bisporus* сравним с животными белками, что, предположительно, позволит снизить потребление мясных продуктов в рационе (Atila et al., 2017). Помимо высокого содержания аминокислот, плодовые тела *A. bisporus* аккумулируют галактоманнан,  $\alpha$ -глюкан и  $\beta$ -глюкан, которые обладают иммуностимулирующим и противоопухолевым действием. Отмечается высокое содержание фенольных соединений, в частности, токоферольной группы (в совокупности — витамин E), для которых показан антиоксидантный эффект. Помимо токоферолов, спорокарпы шампиньона двуспорового формируют такие соединения как галловая кислота, протокатеховая кислота, мирицетин, обладающие сильным антиоксидантным действием (Liu et al., 2013; Semwal et al., 2016; Gąsecka et al., 2018; Jiang et al., 2019). Иммуномодулирующий эффект экстрактов из плодовых тел *Ganoderma lucidum* обуславливается стимулированием Т-клеток, НК-клеток и макрофагов (Pillai et al., 2008; Sanodiya et al., 2009; Smina et al., 2016). Продуцируемые активные соединения обладают иммуномодулирующим, противоопухо-

левым, радиопротекторным, антидиабетическим и гепатопротекторным действием (Zhao et al., 2010; Ma et al., 2015; González et al., 2020; Hu et al., 2020). Полисахариды *G. lucidum* обладают противораковым действием, сдерживая развитие саркомы 180 (Wasser, Weis, 1999; Liu et al., 2002). Спектр аккумулируемых тритерпеноидных соединений показал цитотоксичность по отношению к раковым клеткам, сдерживая их пролиферацию и вызывая апоптоз (Li et al., 2005; Tang et al., 2006; Xia et al., 2020). Герицерон, еринакол и еринацин — соединения, продуцируемые *Hericium erinaceus*, — обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, противовоспалительным и гипогликемическим действием, оказывая тонизирующее влияние на центральную нервную систему и снижая общую утомляемость организма (Wang et al., 2004; Wang et al., 2005; Nagano et al., 2010; Liu et al., 2015; Li et al., 2018). Для видов *H. americanum* и *H. coraloides* также показано образование фенольных соединений, обладающих антиоксидантным действием (Kim et al., 2018; Atila, 2019). Виды рода *Pleurotus* известны как продуценты соединений, обладающих антибиотической, иммуномодулирующей, противоопухолевой, антиоксидантной, противовоспалительной и антивирусной активностью (Gregori et al., 2007; Yang et al., 2013; Ma et al., 2014). Экстракты плодовых тел *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* обладают высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам РС-3 рака простаты, клеткам MCF-7 рака молочной железы, HT-29 рака кишечника, подавляя их пролиферацию путем нарушения клеточного цикла на стадии G0/G1, что приводит к раннему апоптозу (Khan, Tania, 2012; Patel et al., 2012; Deepalakshmi, Sankaran, 2014).

Помимо применения в различных отраслях биотехнологического производства, базидиальные макромицеты представляются перспективными для использования в мероприятиях по биоремедиации экосистем, для которых характерно сильное антропогенное воздействие (Deshmukh et al., 2016). С наращиванием темпов химического производства и обработки нефтепродуктов целесообразным является изучение биоремедиационного потенциала базидиальных макромицетов в отношении широкого спектра ксенобиотиков, к которым относят различные алифатические и полициклические углеводороды, нефть и продукты ее переработки. Ксилотрофные базидиомицеты показали способность к деградации ряда полициклических соединений, синтетических красителей и пестицидов (Eggen, Majcherczyk, 1998; Purnomo et al., 2011; Balaes et al., 2013; Lladó et al., 2013; Rodríguez-Rodríguez et al., 2013; Rosales et al., 2013; Balaes et al., 2014). Помимо этого, отмечена способность разлагать различные алифатические углеводороды и полифенольные соединения (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2009; Ntou-

gias et al., 2015; Young et al., 2015; Kulikova et al., 2016). Важную роль в деградации содержащихся в почве ксенобиотических соединений играет ассоциация ксилотрофных макромицетов с бактериальной микрофлорой (Baldrian, 2008; Pozdnyakova et al., 2008; Zanaroli et al., 2010; Liu et al., 2017; Turkovskaya, Pozdnyakova, 2018).

Ввиду высокого биотехнологического и биоремедиационного потенциала макромицетов, селекции новых линий штаммов, создания новых производственных комплексов, необходимым является изучение влияния длительных периодов хранения на способность культур макромицетов сохранять свою жизнеспособность, формировать плодовые тела, продуцировать активные соединения в объемах, соответствующих значениям до помещения на хранение (Field et al., 1993; Reid, Paice, 1994; Sánchez, 2009; Albu et al., 2020).

## МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ

В поддержании коллекций штаммов макромицетов применяется широкий спектр методов хранения, включающий в себя группу протоколов хранения на агаризованных средах в лиофилизированном и замороженном состоянии. Применение тех или иных методов обуславливается характеристиками изучаемого биоматериала и его способностью сохранять свои свойства и жизнеспособность после длительных периодов хранения согласно выбранным протоколам.

### Хранение на агаризованных средах

В поддержании коллекций штаммов макромицетов широко применяется группа методов субкультивирования — хранения штаммов на агаризованных средах различного состава с регулярным пересевом на новые стерильные носители. Рекомендуемая частота пересевов варьирует в зависимости от скорости роста исследуемых штаммов, температуры хранения и используемых носителей. Серийные пересевы рекомендуется проводить раз в 3 месяца в случае хранения при комнатной температуре и раз в 6–8 месяцев при хранении в холодильных установках (Onions, 1971). Помимо очевидных преимуществ (сравнительная простота, низкая стоимость расходных материалов), данные методики обладают рядом недостатков — повышение риска контаминации культуры, необходимость в наличии больших объемов свободного места, лабораторной посуды и реактивов, что делает поддержание крупных коллекций штаммов затруднительным.

В ряде работ было изучено влияние длительных периодов хранения методами субкультивирования на морфолого-культуральные признаки изучаемых штаммов. Известны морфологические проявления возникающих мутаций (снижение ра-

диальной скорости роста, потеря характерных морфологических структур, снижение вирулентности для фитопатогенных и энтомопатогенных видов и т.д.) (Samšičáková, Kalalova, 1983; Humber, 1997; Bogman et al., 2006). Молекулярные механизмы формирования мутаций при длительном последовательном субкультивировании изучены сравнительно слабо. Известно возникновение одонуклеотидного полиморфизма (ОП) у штаммов, претерпевавших множественные последовательные пересевы. ОП был отмечен в генах *Ganoderma lucidum*, кодирующих ряд ферментов, отвечающих за функционирование мевалонатного пути, синтеза 1,3-β-глюкана и цикла трикарбоновых кислот, после четырех лет субкультивирования при регулярных пересевах каждые 45 сут. ОП был зарегистрирован в 18 из 60 изученных генов, в 14 из них — в районе экзонов. Несинонимичные ОП были найдены в двух генах, кодирующих мевалонатный путь и в пяти генах, ответственных за синтез лигнинразрушающих ферментов. Появление ОП может приводить к изменениям во внутриклеточных биохимических процессах и, с их накоплением, влиять на продукцию биологически активных соединений, их состав, активность (Sakurai et al., 2019).

Помимо стандартного протокола субкультивирования, широко применяется ряд методов хранения штаммов на пробирках со скошенной агаризованной средой под слоем дистиллированной воды или минерального масла, что позволяет повысить продолжительность хранения, увеличив временные промежутки между регулярными пересевами до трех лет, снизить риск высыхания и бактериальной или зоологической контаминации биоматериала (Humber, 1997; Jong, Birmingham, 2001; Nakasone et al., 2004; Richter et al., 2016).

Эффективность хранения на агаризованных средах под слоем стерильной дистиллированной воды была показана для представителей разных таксономических и эколого-трофических групп грибов (Ellis, 1979; Croan et al., 1999; Richter et al., 2010). При этом, отмечено, что ксилотрофные макромицеты, как правило, лучше переживают длительные периоды хранения, сохраняя жизнеспособность после 30 лет хранения при 5°C (Richter, 2008; Richter et al., 2010; Richter et al., 2016). Разработано несколько вариантов хранения культур под слоем дистиллированной воды. Стандартный протокол подразумевает помещение блоков агаризованной среды с развившимся мицелием в запаиваемые стеклянные фиалы со стерильной дистиллированной водой и последующим хранением при комнатной температуре (Castellani, 1963). Модификации данного метода предлагают использовать пробирки с ватно-марлевыми пробками или завинчивающимися крышками, замену дистиллированной воды физиологическим р-ром и дальнейшее хранение при 5°C (Burdall, Dor-

worth, 1994). Может применяться асептическое внесение дистиллированной воды в пробирки со скошенной агаризованной средой с развившимся мицелием. Помимо этого, возможна закладка на хранение в холодильнике суспензии спор и фрагментов мицелия. В случае необходимости может проводиться добавление антибиотика в дистиллированную воду для снижения риска бактериальной контаминации в процессе хранения (Benedek, 1962; Castellani, 1963; McGinnis et al., 1974; de Capriles et al., 1989; Jong, Birmingham, 2001; Maia et al., 2012; Singh et al., 2018; Castro-Rios, Bermeo-Escobar, 2021).

Использование минеральных масел в хранении штаммов макромицетов также позволяет значительно увеличить временные промежутки между посевами до двух лет, снизить риск бактериального и зоологического инфицирования культур (Stebbins, Robbins, 1949; Fennell, 1960). Стандартная методика хранения культур подразумевает внесение стерильного минерального масла в пробирку поверх скошенной среды с мицелием и дальнейшим хранением при комнатной температуре или в холодильной камере (Perrin, 1979; Humber, 1997). Эффективность протоколов хранения под слоем минерального масла показана для разных таксономических и эколого-трофических групп грибов. Тем не менее, применение данных протоколов осложняется высокой трудозатратностью, большими объемами занимаемого пространства для хранения пробирок и необходимостью освобождать фрагменты биоматериала от излишков минерального масла после изъятия с хранения. В ряде работ были показаны противоречивые результаты в способности закладываемых штаммов сохранять свою жизнеспособность после длительных периодов хранения под слоем минерального масла (Buell, Weston, 1947; Stebbins, Robbins, 1949; Smith, Onions, 1983; Johnson, Martin, 1992; Homolka, Lisá, 2008; Colauto et al., 2012b). Расхождение в результатах может быть связано не только с разной молекулярной массой используемого минерального масла и возможной контаминацией пробирок, но и с видо- и, предположительно, штаммоспецифичностью. Исходя из этого, использование минерального масла и дистиллированной воды в хранении коллекций штаммов целесообразно использовать в комплексе с традиционным серийным посевом культур и методами криохранения (Psurtseva et al., 2014).

### Хранение в лиофилизированном состоянии

Протоколы сублимационной сушки широко распространены в хранении биоматериала дрожжеподобных и мицелиальных микромицетов, формирующих конидии и хламидоспоры. Для неспорулирующих базидиальных макромицетов метод лиофилизации применяется сравнительно редко. Данные об эффективности лиофилизации

для сохранения жизнеспособности мицелия базидиальных грибов разнятся. Закладывание штаммов по стандартной методике, включающей использование агаровых блоков, помещенных в 10%-й р-р трегалозы, показало свою неэффективность (Palacio et al., 2014). Тем не менее, сохранение жизнеспособности после хранения в сублимированном состоянии в течение двух месяцев было отмечено для ряда видов базидиальных макромицетов (Smith, Onions, 1983; Tan et al., 1991; Sundari, Adholeya, 1999; Ivanushkina et al., 2010; Homolka, 2014).

Был предложен протокол подготовки образцов мицелия макромицетов к лиофильной сушке, включающий (Sundari, Adholeya, 1999):

1. Определение наиболее оптимального возраста культуры. Для этого проводилось внесение агаровых блоков с мицелием исследуемого штамма в криопробирки с раствором криопротектора и замораживание до  $-30^{\circ}\text{C}$  с последующим помещением блока на чашки Петри, изучением скорости роста и выбором наиболее оптимального криопротектора.

2. Проведение предварительной двухступенчатой заморозки агаровых блоков с мицелием в среде с содержанием криопротектора до  $-100^{\circ}\text{C}$  с последующим помещением в сублимационную установку.

3. Подбор регидратирующего р-ра (стерильная дистиллированная вода, жидкая питательная среда Мелин–Норкранс, на которой ранее развивался мицелий, р-р суслы).

Для штамма вида *Laccaria fraterna*, подготовленного к лиофилизационной сушке по указанному протоколу, наибольшую устойчивость к низким температурам и вакуумной сушке показал мицелий возрастом от трех до семи недель, помещенный в 10%-й р-р диметилсульфоксида (ДМСО). Данный протокол был успешно применен к штаммам видов *L. amethystina*, *L. laccata* и др. (Sundari, Adholeya, 1999). Было показано, что хранение в сублимированном состоянии не оказывает негативного действия на активность амилаз, липаз, уреаз, целлюлаз и лигнинразрушающих ферментов штаммов видов *L. amethystina*, *L. fraterna*, *L. laccata* и ряда других (Sundari, Adholeya, 2000a, 2000b).

При закладке биоматериала на хранение методами лиофилизационной сушки возможно применение питательных субстратов-носителей. Сохранение жизнеспособности после сублимации было показано для мицелия штаммов *Agaricus bisporus*, *A. bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Volvariella volvacea*, развившегося на зернах жемчужного проса, использованного в качестве носителя биоматериала (Singh et al., 2004a).

Применение лиофилизации в хранении культур базидиальных макромицетов представляется

перспективным направлением. Тем не менее, для сохранения жизнеспособности исследуемых культур необходим поиск оптимальных условий культивирования, криопротекторных соединений и их комбинаций, субстратов-носителей, создание более специализированных протоколов заморозки (Croan, 2000; Singh et al., 2004b; Palacio et al., 2014).

### Хранение при отрицательных температурах

Хранение при отрицательных температурах (криохранение) – группа методов поддержания коллекций штаммов путем заморозки биоматериала культур микроорганизмов с последующим их содержанием при широком спектре отрицательных температур. На данный момент методы криохранения считаются наиболее надежным и эффективным способом сохранения жизнеспособности штаммов макромицетов, не требующим больших затрат лабораторного оборудования и расходных материалов. Необходимым остается наличие холодильных установок, обеспечивающих хранение биоматериала при спектре температур от  $-80$  до  $-196^{\circ}\text{C}$  (Humber, 1997; Ryan, Smith, 2007; Homolka, 2013; Singh, Baghela, 2017). Создан ряд протоколов по криохранению культур макромицетов, включающих в себя подбор температуры хранения, скорости заморозки, использование субстратов-носителей и криопротекторных соединений (Homolka et al., 2006; Ozerskaya et al., 2013; Wolkers, Oldenhof, 2021; Linde et al., 2018; Sato et al., 2019).

### Температура хранения

Одним из факторов, влияющих на сохранение жизнеспособности культур, является температура хранения исследуемых штаммов и скорость заморозки биоматериала. Наиболее распространено использование морозильных установок, обеспечивающих хранение биоматериала при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ , в том числе и в связи со сравнительной доступностью подобных охладителей. Одним из наиболее эффективных протоколов заморозки считается охлаждение биоматериала до температур ниже  $-139^{\circ}\text{C}$ . Применяется также и хранение в парах жидкого азота при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ , что, согласно ряду сообщений, может обеспечивать наиболее высокую геномную и фенотипическую стабильность (Ryan, Smith, 2007). Возможно использование бытовых морозильных установок, осуществляющих заморозку культур до  $-20^{\circ}\text{C}$ , но протоколы содержания штаммов макромицетов в спектре температур от  $-20$  до  $-60^{\circ}\text{C}$  применяются сравнительно редко ввиду более высокого риска получения культурами криотравм широкого спектра (Humber, 1997). Тем не менее, для *Pleurotus ostreatus* было показано успешное применение протоколов хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ , включающих использование криопротекторных соединений (глю-

коза, сахароза, глицерин и т.д.) и питательного субстрата в виде зерен пшеницы, овса, риса и блоков картофельно-глюкозного агар в качестве контроля (Mantovani et al., 2012).

Известно, что микроструктура кристаллов льда меняется в зависимости от температуры, скорости ее понижения и атмосферного давления. В процессе охлаждения воды от  $0$  до  $-25^{\circ}\text{C}$  происходит последовательное образование кристаллов льда в форме тонких гексагональных пластин, игл, полых колонн из призм, древоподобных структур и, снова, гексагональных пластин, наносящих механические повреждения гифам гриба и цитоплазматическим структурам (Mason et al., 1963; Linde et al., 2018). Помимо механических повреждений, вызываемых кристаллами льда, следствием медленного замораживания является также и резкое повышение концентрации электролитов, растворенных в цитоплазме и окружающем гифы пространстве, например, питательной среде. Это связано с потерей внутриклеточной воды и приводит к необратимым изменениям в структуре клеточных белков (Lovelock, 1953a; Lovelock, 1953b). Микроструктуры льда, формирующиеся в межклеточном пространстве, как правило, несут меньшую опасность по сравнению с внутриклеточными кристаллами (Pegg, 2010).

Известно, что сохранение жизнеспособности биоматериала зависит и от скорости заморозки, которая влияет на транспорт жидкой фазы в клеточной мембране (Mazur, 1963). Скорость заморозки биоматериала влияет на скорость изменения концентрации растворенных в цитоплазме и окружающей клетки жидкости соединений, от чего зависит объем воды, покидающей клетку в процессе заморозки и возвращающейся обратно в процессе оттаивания, и скорость этих процессов. В процессе замораживания вода выходит из клетки, что приводит к повышению концентрации растворенных соединений, что, в свою очередь, снижает температуру, необходимую для ее перехода в твердое состояние, позволяя сохранить цитоплазму в охлажденном, но не кристаллизованном состоянии. При слишком быстрой заморозке жидкая фракция не успевает покинуть клетку в достаточном объеме, что приводит к формированию внутриклеточных кристаллов льда, наносящих летальные повреждения клеткам (Mazur, 1963; Mazur et al., 1984; Mazur et al., 1992; Karlsson et al., 1993; Smith, Thomas, 1997). В свою очередь, слишком медленный процесс заморозки вызывает излишнюю дегидратацию клетки, что также приводит к гибели клеток. Тем не менее, предполагается, что образование внутриклеточных кристаллов льда не является прямой причиной гибели клеток (Farrant, 1977; Fowler, Toner, 2005). Была представлена гипотеза, утверждающая, что смерть биоматериала может быть связана с процессом перекристаллизации, происходящим при оттаива-

нии клеток (Mazur, 2010). В пользу данной гипотезы говорит тот факт, что ряд видов дрожжевых и мицелиальных микромицетов, обитающих в экотопях с температурами, близкими к нулю, способны к формированию и накоплению больших объемов ингибиторов перекристаллизации белковой природы, т.н. “лед-связывающих протеинов” (Lee et al., 2010; Xiao et al., 2010; Arai et al., 2019).

Вычисление оптимальной скорости заморозки культур было объектом ряда исследований. Для сохранения жизнеспособности штаммов бактерий и грибов чаще всего применяют скорость заморозки в  $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (Hwang, 1960, 1966, 1968; Morris et al., 1988; Smith, Thomas, 1997; Ivanushkina et al., 2010; Lalaymia et al., 2014). Для достижения таких значений скорости снижения температуры используют программируемые морозильные установки или термоохлаждаемые контейнеры. Подобная скорость является стандартной и для крио-заморозки тканей, отдельных клеток и эмбрионов высших животных (Leibo, 1986; Rubinsky et al., 1988). Для культур грибов рекомендуется также применять методы быстрого оттаивания культур, например, помещение в теплую воду, что позволяет избежать рекристаллизации льда в процессе медленного размораживания биоматериала (Kolkowski, Smith, 1995). Тем не менее, возможно применение и заморозки с неизвестной скоростью снижения температуры (неконтролируемой заморозки), подразумевающей помещение биоматериала в холодильную установку без указанного оборудования (Kitamoto et al., 2002).

Учитывая крайне высокое таксономическое и эколого-трофическое разнообразие макромицетов, механизмов захвата субстрата и его переработки, представляется необходимой разработка методик криохранения, специфичных для определенных групп видов (Homolka, 2014; Zaghi et al., 2020). Помимо использования оптимальной температуры хранения, не менее важным в протоколах криохранения является использование криопротекторных соединений и субстратов-носителей.

### Криопротекторные соединения

В процессе замораживания происходит формирование внеклеточных кристаллов льда, оказывающих осмотическое давление на клеточные мембраны биоматериала. Медленное замораживание позволяет избежать формирования крупных кристаллов льда внутри клетки, но может приводить к излишней дегидратации клеток, что в свою очередь, является причиной их гибели из-за резкого повышения концентрации внутриклеточных электролитов (Mazur, 2010). Сохранение жизнеспособности культур макромицетов зависит не только от целостности клеточных мембран, но и от их способности противостоять резким скачкам осмотического давления в процессе заморажива-

ния биоматериала и связанного с ним повышения содержания растворенных соединений. Применение криопротекторных соединений (КПС) необходимо как для искусственного увеличения общей концентрации растворенных соединений в протопласте клеток, так и для обеспечения их плавной дегидратации. Как правило, замораживание культур без добавления КПС приводит к гибели биоматериала (Lovelock, 1953b; Zaghi et al., 2018).

Для льда характерны как группа кристаллических фаз, так и аморфная форма. Среди 18 известных на сегодняшний день кристаллических фаз льда наиболее распространенной является гексагональная форма  $I_h$ , образующаяся во время медленной кристаллизации воды при атмосферном давлении на уровне моря (Fang et al., 2013; Zhu et al., 2020; Salzmann et al., 2021). Процесс перехода жидкой фазы в твердую состоит из двух фаз: стадии нуклеации и стадии роста кристаллов. Нуклеация происходит случайным образом в процессе броуновского движения, когда молекулы воды могут сформировать спонтанную, подобную льду структуру, но для формирования кристаллов льда необходимо, чтобы структуры превышали т.н. критический размер зародыша, находящегося в неустойчивом равновесии с окружающей средой. С понижением температуры жидкости и, соответственно, снижением скорости смещения молекул вероятность формирования “ядер” повышается. При увеличении числа молекул в зародыше кристалла, возможным становится его увеличение в размерах (Alexiades, Solomon, 1986).

Аморфная форма льда в чистой воде или другой однокомпонентной среде может сформироваться только при высоком давлении и крайне быстром охлаждении  $p$ -ра ( $>10^7 \text{ K} \times \text{s}^{-1}$ ) (Whalley et al., 1989; Kolesnikov et al., 1999; Wolfe, Bryant, 1999). Добавление раствора КПС приводит к увеличению вязкости жидкой фракции биоматериала, связыванию молекул воды, что усложняет процесс формирования зародышей льда, что, в свою очередь, снижает температурную точку кристаллизации, переводя воду в переохлажденное состояние и, при дальнейшем охлаждении, превращая ее в стеклоподобную, аморфную форму (Wolfe, Bryant, 1999; Mandumpal et al., 2011). Таким образом, добавление криопротекторных соединений уменьшает не только объем кристаллического льда, образуемого при заморозке биоматериала, но и смягчает скачок концентрации растворенных электролитов, тем самым позволяя сохранить целостность клеточных стенок мицелия и, следовательно, его жизнеспособность (Wolkers, Oldenhof, 2021).

Криопротекторы можно классифицировать разными способами (Тао, Ли, 1986; Hubálek, 2003; Homolka, 2013; Singh, Baghela, 2017):

1. По способности проникать через клеточные покровы [клеточные стенки (КС) и цитоплазма-

тические мембраны (ЦПМ)] – проникающие [диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин), полупроницающие (моно- и олигосахариды, аминокислоты и т.д.) и не проникающие (полисахариды, протеины, полимеры с высокой молекулярной массой)].

2. По скорости проникновения через клеточные покровы. Быстропроникающие (не более 30 мин) – этиленгликоль, ДМСО, диметилформамид. К сравнительно медленно проникающим веществам относят глицерин, моно-, олигосахариды, аминокислоты и др.

3. По химической структуре и молекулярной массе. Диолы (полиэтиленгликоль, пропиленгликоль и др.), моносахариды (глюкоза, ксилоза), дисахариды (сахароза, трегалоза) и т.д.

Проникающие криопротекторные соединения, диффундируя через ЦПМ, связываются с внутриклеточной водой, что приводит к снижению точки кристаллизации воды и уменьшению концентрации растворенных электролитов, сохраняя протоплазму в жидком состоянии, что, в свою очередь, защищает клетки от формирования внутриклеточных кристаллов льда и снижает негативный эффект от повышения концентрации растворенных во внутриклеточном матриксе соединений (Chen et al., 1984; Tao, Li, 1986; Chaytor et al., 2012). Полупроницающие криопротекторы вызывают частичную дегидратацию клеток перед замораживанием. Накапливаясь в пространстве между мембраной и клеточной стенкой, они действуют как буферный слой, защищающий мембрану от механических повреждений, наносимых кристаллами льда. Непроницающие КПС не вступают в непосредственное взаимодействие с клеточными покровами, но вызывают частичный отток внутриклеточной жидкости, повышают вязкость окружающего клетку р-ра, что тормозит рост кристаллов льда (Olien, Smith, 1981; Colauto et al., 2012b). К негативным эффектам от применения проникающих криопротекторных соединений относят их цитотоксичность, растущую с повышением концентрации р-ра, применяемого криопротектора. К наиболее распространенным видам повреждений, вызываемых проникающими КПС, относят нарушение работы сигнальной системы клеток, повреждение митохондрий, встраивание в элементы цитоскелета (Chaytor et al., 2012; Best, 2015).

ДМСО (диметилсульфоксид) – окисленный тиоэфир, обладающий хорошей растворимостью в воде и криопротекторным эффектом, линейно зависящим от концентрации. ДМСО в качестве криопротекторного соединения широко применяется в хранении культур грибов, бактерий, клеток высших животных, что обусловлено его способностью связывать широкий спектр плохо растворимых полярных и неполярных молекул и быстро проникать через клеточные покровы

(Hubálek, Kochková-Kratochvilová, 1978; Brayton, 1986; Galvao et al., 2014). Помимо криопротекторного действия, ДМСО обладает свойствами радиопротектора (Chapman et al., 1979). В ряде исследований была показана высокая цитотоксичность ДМСО, выражающаяся в угнетении роста колоний, подавлении экспрессии генов, индуцировании оксидативного стресса и апоптоза (MacGregor, 1967; Rammner, Zaffaroni, 1967; Typke, 1996; Randhawa, 2008; Momose et al., 2010; Colauto et al., 2012b). Было отмечено, что сохранение жизнеспособности при использовании протоколов криохранения с применением ДМСО штаммоспецифично и, предположительно, зависит от эластичности клеточных покровов и их толщины (Tomizawa et al., 2007; Colauto et al., 2012a).

Глицерин – один из наиболее широко применяемых КПС, используемых в криохранении биоматериалов различного биологического происхождения, показавший высокую эффективность в сохранении жизнеспособности культур базидиальных макромицетов, в том числе эктомикоризных видов (Tanaka et al., 2013; Linde et al., 2018). В ряде работ было показано, что для криохранения культур базидиомицетов наиболее оптимальными являются 5%-й и 10%-й р-ры глицерина (Ito, Nakagiri, 1996; Mantovani et al., 2012; Linde et al., 2018; Sato et al., 2019).

Глюкоза – полупроницающий криопротектор, также применяемый в протоколах криохранения культур базидиальных макромицетов. Тем не менее, было показано, что использование р-ра глюкозы в качестве КПС приводит к снижению жизнеспособности биоматериала базидиомицетов после длительных периодов хранения. Выживаемость зернового мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus* после двух лет хранения составила 97.6% с добавлением р-ра глюкозы и 93% – без криопротектора. На пятый год хранения процент жизнеспособных культур составил 88.6 и 91%, соответственно. При этом штаммы вида *Agaricus subrufescens* после двух лет хранения показали в среднем 94.4% сохранения жизнеспособности при добавлении р-ра глюкозы и 98.3% – без р-ра КПС. После пяти лет выживаемость составила 65% в пробирках с добавлением р-ра глюкозы и 86% – в его отсутствие (Zaghi et al., 2020). Потерю жизнеспособности культур базидиальных макромицетов можно связать с цитотоксичностью глюкозы, а также с индивидуальными характеристиками штаммов изученных видов (Tchounwou et al., 2014). Цитотоксичное действие глюкозы возникает при превышающих норму значениях внутриклеточной концентрации глюкозы и выражается в развитии оксидативного стресса, стресса ЭПР, митохондриального стресса, что приводит к выбросу активных форм кислорода и гибели клетки (Tesaro, Mazzotta, 2020).

Положительный эффект применения р-ра сахарозы в качестве КПС был отмечен для ряда бактериальных штаммов, вирусов и облигатного симбионта *Rhizophagus intraradices*, образующего арбускулярную микоризу (Calcott, MacLeod, 1974; Sehgal, Das, 1975; Chavarri et al., 1988; Declerck, Angelo-Van Coppenolle, 2000; Panoff et al., 2000). При этом опыт использования сахарозы в криохранении базидиальных грибов сравнительно небольшой. Применение р-ров сахарозы различной концентрации показало хорошие результаты для штаммов видов *Agaricus blazei*, *A. subrufescens*, *Lentinus crinitus* и *Pleurotus ostreatus* (Colauto et al., 2012b; Mantovani et al., 2012; Zaghi et al., 2018; Bertélli et al., 2022).

Трегалоза – дисахарид, накапливаемый в цитозоле растительных и грибных клеток, в частности, в покоящихся структурах (споры, склероции и клетки, находящиеся в стационарной фазе развития), нашедший широкое применение в криохранении бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов (Jorge et al., 1997; Garg et al., 2002; Patist, Zoerb, 2005; Mahmud et al., 2009). Повышение концентрации трегалозы во внутриклеточном матриксе было отмечено для клеток, претерпевающих дегидратацию и другие формы стресса (Ribeiro et al., 1999; Saharan, Sharma, 2010). В случае наступления неблагоприятных условий повышение содержания трегалозы необходимо для стабилизации мембранных фосфолипидов и протеинов, что позволяет клетке сохранить жизнеспособность (Tereshina et al., 2011; Feofilova et al., 2014).

Положительные результаты в сохранении жизнеспособности культур базидиальных макромицетов были показаны для протоколов криохранения, включающих в себя использование смешанных р-ров КПС. Сохранение жизнеспособности культур эктомикоризных базидиомицетов при закладывании биоматериала на криохранение было показано для ряда протоколов, включающих в себя использование комбинаций проникающих и непроникающих криопротекторов. Применение комбинированных р-ров КПС с различными концентрациями компонентов позволяет усилить криопротекторный эффект без повышения риска нанесения повреждений биоматериалу, связанных с токсичностью отдельных составляющих смеси КПС (Sato et al., 2019; Sato et al., 2020).

### Использование субстратов-носителей

На сегодняшний день, широко распространено использование метода “агаровых блоков”, подразумевающего помещение фрагментов агаризованной среды с развившимся мицелием в раствор КПС с дальнейшим замораживанием (Hwang, 1960; Hwang, 1966; Hwang, 1968). К модификациям данного метода относят широко распространенные варианты протокола с использованием трубочек

из полипропилена или ПВХ, внутрь которых проводится помещение блоков агаризованной среды с мицелием с дальнейшим запаиванием краев и замораживанием (Elliott, 1976; Challen, Elliott, 1986; Stalpers et al., 1987; Hoffmann, 1991; Homolka et al., 2003; Colauto et al., 2012b). Разработан протокол криохранения, включающий в себя выращивание культур в криопробирках со скошенной агаризованной средой с дальнейшим внесением раствора КПС и помещением в морозильную установку (Vouyon et al., 2009; Crahay et al., 2013). Метод “агаровых блоков” и его модификации показали высокую эффективность в хранении широкого спектра видов макромицетов, но, тем не менее, не все базидиальные макромицеты могут сохранять жизнеспособность после длительных периодов хранения согласно указанным протоколам, например, виды, образующие эктомикоризу (Ito, Nakagiri, 1996; Danell, Flygh, 2002; Crahay et al., 2013; Sato et al., 2019).

Разработаны протоколы криохранения с использованием минеральных и органических субстратов-носителей. Среди минеральных субстратов-носителей можно выделить вспененный перлит различных фракций – аморфную алюмосиликатную породу вулканического происхождения, обладающую высокими адсорбционными и теплоизолирующими характеристиками (Sodeyama et al., 1999). Был предложен “перлитовый протокол”, включающий в себя инокуляцию биоматериалом исследуемых штаммов стерильного смоченного жидкой питательной средой с добавлением КПС перлита, с дальнейшей инкубацией и помещением в морозильную установку (Homolka et al., 2001).

Замораживание штаммов проходит через следующие этапы: образец биоматериала подвергается охлаждению с падением температуры до точки замерзания воды. При дальнейшем охлаждении начинает запускаться процесс нуклеации, который приводит к резкому скачку температуры в участке около точки кристаллизации до уровня точки замерзания жидкой фракции. Скачок температуры связан с выбросом скрытой теплоты образца, которая покидает объем биоматериала. Затем, происходит дальнейшее охлаждение уже кристаллизованного образца до установленной программой температуры (Tan et al., 2021). Использование обладающего высокими теплоизолирующими характеристиками вспененного перлита позволяет значительно сгладить скачок температур в процессе замораживания, что, предположительно, может оказывать положительный эффект на сохранение жизнеспособности и характеристик штаммов при закладке на хранение. Помимо этого, применение вспененного перлита в качестве субстрата-носителя позволяет значительно увеличить объем биоматериала штамма, находящегося на хранении в стандартных криопробирках, по сравнению с протоколами метода “агаровых бло-



ков” (Homolka et al., 2001). В отличие от протоколов метода “агаровых блоков”, подразумевающих вырезание блоков среды с мицелием и помещением в раствор КПС, при использовании “перлитового протокола” мицелий изучаемого штамма не подвергается механическим повреждениям в процессе изъятия из слоя агаризованной среды (Homolka et al., 2001).

Данный протокол показал свою эффективность в хранении широкого спектра видов микро- и макромицетов и ряда дрожжей (Homolka et al., 2007; Homolka, 2014). Были разработаны модифицированные варианты “перлитового протокола”, включающие в себя введение раствора КПС за короткий промежуток времени перед заморозкой, а не в начале периода инкубации, которые были успешно применены в хранении ряда видов эктомикоризных базидиомицетов (Sato et al., 2012; Sato et al., 2019).

Высокая эффективность была показана для протоколов криохранения культур базидиомицетов с использованием зерен пшеницы, проса, риса, подвергнутых паровой и тепловой обработке (Colauto et al., 2011; Linde et al., 2018; Bertéli et al., 2022). Для штамма *Agaricus bisporus* было показано сохранение жизнеспособности при использовании зерен пшеницы в качестве субстрата-носителя в отсутствие криопротекторных соединений (Mata, Estrada, 2005). Эндосперм зерен сельскохозяйственных культур отличается высоким содержанием крахмала, ряда аминокислот и жирных кислот, служащих богатым источником питания для мицелия (Šramková et al., 2009; Kowieska et al., 2011). Содержащиеся в эндосперме зерна углеводы и белки связывают молекулы воды, снижая объем свободной воды и, следовательно, количество внеклеточных кристаллов льда, сводя к минимуму риск получения биоматериалом механических повреждений. Помимо этого, важную роль может играть капиллярная микроструктура эндосперма зерна, которая ограничивает объем свободной воды, что препятствует формированию внеклеточных кристаллов льда (Tanaka et al., 2013; Marsola et al., 2022). Вместе с этим, содержащийся в зернах крахмал относится к группе непроникающих криопротекторов, оказывая дополнительный положительный эффект на выживаемость биоматериала на протяжении периодов криохранения (Singh, Baghela, 2017). Протокол с использованием зерен проса также показал свою высокую эффективность в отсутствие раствора криопротектора для мицелия ряда коммерческих штаммов макромицетов (Mata, Pérez-Merlò, 2003).

Вместе с зерновым материалом сельскохозяйственных культур в криохранении культур базидиальных макромицетов применяют целлюлозо-содержащие субстраты-носители. Использование опилок бука городчатого (*Fagus crenata*) в качестве субстрата-носителя показало свою эффектив-

ность для культур видов, относящихся к отделам *Oomycota*, *Mucoromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*, в том числе в варианте протокола без добавления р-ра КПС и при неконтролируемой скорости замораживания (Kitamoto et al., 2002). Для сохранения жизнеспособности культур эктомикоризных базидиомицетов были разработаны протоколы криохранения с использованием содержащей активированный уголь фильтровальной бумаги и измельченного вермикулита в качестве субстратов-носителей (Stielow et al., 2012; Sato et al., 2020).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Базидиальные макромицеты обладают значительным пищевым, биотехнологическим и биоремедиационным потенциалом, что делает их перспективными объектами исследований. С расширением списка изученных видов и видов, применяемых на пищевых и биотехнологических производствах, необходимым является создание коллекций штаммов, использующих протоколы хранения, обеспечивающие сохранение жизнеспособности, физиологических и биохимических свойств на протяжении длительного периода хранения. За последние годы был разработан ряд перспективных протоколов криохранения, включающих в себя использование субстратов-носителей и комбинаций криопротекторных соединений, показавших свою эффективность для чувствительных к замораживанию видов. Вместе с этим, перспективной является разработка протоколов с применением процесса сублимационной сушки. Во избежание потери ценных штаммов, необходимым представляется осуществление многолинейного хранения, включающего в себя хранение культур комплексом методов, к которым относят как протоколы хранения на агаризованных средах, так и протоколы криохранения.

Выражаем глубокую благодарность в.н.с. БИН РАН к.б.н. Н.В. Псурцевой за помощь в ознакомлении с основными методами хранения культур базидиальных макромицетов и проф. кафедры биохимии МГУ д.б.н. А.М. Рубцову за проведение сублимационной сушки культур нашей коллекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahlawat O.P., Manikandan K., Singh M. Proximate composition of different mushroom varieties and effect of UV light exposure on vitamin D content in *Agaricus bisporus* and *Volvariella volvacea*. Mushroom Research. 2016. V. 25 (1). P. 1–8.
- Albu C.V., Rădoi T.A., Diguță C.F. et al. Screening among micro and macromycetes for laccase production. AgroLife Scientific Journal. 2020. V. 9 (1). P. 11–16.
- Alexiades V., Solomon A.D. Critical radius for nucleation. Oak Ridge National Lab., 1986.  
<https://doi.org/10.2172/5762299>

- Arai T., Fukami D., Hoshino T. et al. Ice-binding proteins from the fungus *Antarctomyces psychrotrophicus* possibly originate from two different bacteria through horizontal gene transfer. The FEBS journal. 2019. V. 286 (5). P. 946–962.  
https://doi.org/10.1111/febs.14725
- Atila F. Evaluation of suitability of various agro-wastes for productivity of *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus eryngii* mushrooms. J. Experimental Agriculture International. 2017. V. 17 (5). P. 1–11.  
https://doi.org/10.9734/JEAI/2017/36346
- Atila F. Comparative evaluation of the antioxidant potential of *Hericium erinaceus*, *Hericium americanum* and *Hericium coralloides*. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus. 2019. V. 18 (6). P. 97–106.  
https://doi.org/10.24326/asphc.2019.6.10
- Atila F., Owaid M.N., Shariati M.A. The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: a review. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 2017. V. 7 (3). C. 281–286.  
https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.281-286
- Balaş T., Mangalagiu I.I., Tănase C. Lignicolous macromycetes: Potential Candidates for Bioremediation of Synthetic Dyes. Revta Chimie. 2013. V. 64 (9). P. 790–795.  
https://doi.org/10.2478/s11535-014-0302-5
- Balaş T., Tănase C., Butnariu C. The use of heavy metals in mycoremediation of synthetic dyes. Open Life Sci. 2014. V. 9 (7). P. 659–667.  
https://doi.org/10.2478/s11535-014-0302-5
- Baldrian P. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. Fungal Ecol. 2008. V. 1 (1). P. 4–12.  
https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.02.001
- Benedek T. Fragmenta mycologica. II. On Castellani's "water cultures" and Benedek's "mycotheca" in chlorallactophenol. Mycopathologia. 1962. V. 17 (3). P. 255–260.  
https://doi.org/10.1007/BF02279298
- Bertéli M.B.D., Pinheiro C.R., Philadelpho B.O. et al. Long-term cryopreservation of *Lentinus crinitus* strains by wheat grain technique. J. Microbiol. Methods. 2022. V. 198.  
https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106491
- Best B.P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. Rejuvenation Research. 2015. V. 18 (5). P. 422–436.  
https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656
- Bisko N.A., Sukhomlyn M.M., Mykchaylova O.B. et al. Ex situ conservation of rare and endangered species in mushroom culture collections of Ukraine. Ukrainskiy botanichnyi zhurnal. 2018. V. 75 (4). P. 338–347.  
https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.04.338
- Borman A.M., Szekely A., Campbell C.K. et al. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. Mycopathologia. 2006. V. 161 (6). P. 361–368.  
https://doi.org/10.1007/s11046-006-0023-z
- Brayton C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. The Cornell Veterinarian. 1986. V. 76 (1). P. 61–90.
- Buell C.B., Weston W.H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. American Journal of Botany. 1947. V. 34 (10). P. 555–561.  
https://doi.org/10.2307/2437337
- Burdsall H.H. Jr., Dorworth E.B. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. Mycologia. 1994. V. 86 (2). P. 275–280.  
https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026408
- Calcott P.H., MacLeod R.A. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: a theoretical and practical study. Can. J. Microbiol. 1974. V. 20 (5). P. 671–681.  
https://doi.org/10.1139/m74-103
- Castellani A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. Mycopathologia. 1963. V. 20. (1). P. 1–6.  
https://doi.org/10.1007/BF02054872
- Castro-Rios K., Bermeo-Escobar L.P. Methods for the culture conservation of edible and medicinal fungi. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 2021. V. 10 (4). P. 620–625.  
https://doi.org/10.15414/jmbfs.2021.10.4.620-625
- Challen M.P., Elliot T.J. Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. J. Microbiol. Methods. 1986. V. 5 (1). P. 11–22.  
https://doi.org/10.1016/0167-7012(86)90019-9
- Chang S.T. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, in China. Int. J. Medicinal Mushrooms. 1999. V. 1 (4). P. 291–300.  
https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v1.i4.10
- Chapman J.D., Doern S.D., Reuvers A.P. et al. Radioprotection by DMSO of Mammalian Cells Exposed to X-Rays and to Heavy Charged-Particle Beams. Radiation and Environmental Biophysics. 1979. V. 16 (1). P. 29–41.  
https://doi.org/10.1007/BF01326894
- Chavarri F.J., De Paz M., Nuñez M. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains. Biotechnology Letters. 1988. V. 10 (1). P. 11–16.  
https://doi.org/10.1007/BF01030016
- Chaytor J.L., Tokarew J.M., Wu L.K. et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. Glycobiology. 2012. V. 22 (1). P. 123–133.  
https://doi.org/10.1093/glycob/cwr115
- Chen T.H.H., Kartha K.K., Constabel F. et al. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. Plant Physiology. 1984. V. 75 (3). P. 720–725.  
https://doi.org/10.1104/pp.75.3.720
- Colauto N.B., Cordeiro F.A., Geromini K.V.N. et al. Viability of *Agaricus blazei* after long-term cryopreservation. Anns Microbiol. 2012b. V. 62 (2). P. 871–876.  
https://doi.org/10.1007/s13213-011-0368-5
- Colauto N.B., da Eira A.F., Linde G.A. Cryopreservation at –80°C of *Agaricus blazei* on rice grains. World J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 27 (12). P. 3015–3018.  
https://doi.org/10.1007/s11274-011-0772-9
- Colauto N.B., da Eira A.F., Linde G.A. Cryopreservation of *Agaricus blazei* in liquid nitrogen using DMSO as cryoprotectant. Biosci. J. 2012a. V. 28 (6). P. 1034–1037.
- Crahay C., Declerck S., Colpaert J.V. et al. Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. Fungal Biol. 2013. V. 117 (2). P. 103–111.  
https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.003

- Croan S.C. Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting *Basidiomycotina*. *Mycologia*. 2000. V. 92 (4). P. 810–817.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061223>
- Croan S.C., Burdsall H.H. et al. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. *Mycologia*. 1999. V. 91 (5). P. 908–916.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061098>
- Danell E., Flygh G. Cryopreservation of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycol. Res.* 2002. V. 106 (11). P. 1340–1342.  
<https://doi.org/10.1017/S0953756202006706>
- de Capriles C.H., Mata S., Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 1989. V. 106. P. 73–79.  
<https://doi.org/10.1007/BF00437084>
- Declerck S., Angelo-Van Coppenolle M.G. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 2000. V. 148 (1). P. 169–176.  
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00740.x>
- Deepalakshmi K., Sankaran M. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J. Biochem. Technol.* 2014. V. 5 (2). P. 718–726.
- Deshmukh R., Khardenavis A.A., Purohit H.J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 2016. V. 56 (3). P. 247–264.  
<https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Eggen T., Majcherzyk A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 1998. V. 41 (2). P. 111–117.  
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00002-X)
- Elliott T.J. Alternative ampoule for storing fungal cultures in liquid nitrogen. *Trans. British Mycol. Soc.* 1976. V. 67 (3). P. 545–546.  
[https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(76\)80197-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(76)80197-0)
- Ellis J.J. Preserving Fungus Strains in Sterile Water. *Mycologia*. 1979. Vol. 71 (5). P. 1072–1075.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021113>
- Fang Y., Xiao B., Tao J. et al. Ice phases under ambient and high pressure: Insights from density functional theory. *Physical Review B*. 2013. V. 87 (21). P. 1–6.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.87.214101>
- Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philosophical Transact. Royal Soc. London. Ser. B. Biol.* 1977. V. 278 (959). P. 191–205.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0037>
- Fennell D.I. Conservation of fungous cultures. *Botanical Review*. 1960. V. 26 (1). P. 79–141.  
<https://doi.org/10.1007/BF02860481>
- Feofilova E.P., Usov A.I., Mysyakina I.S. et al. Trehalose: Chemical Structure, Biological Functions, and Practical Application. *Microbiology*. 2014. V. 83 (3). P. 184–194.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261714020064>
- Field J.A., Jong E.D., Feijoo-Costa G. et al. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 1993. V. 11 (2). P. 44–49.  
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90121-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90121-O)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Fowler A., Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Annls N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1066. P. 119–135.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>
- Furlani R.P.Z., Godoy H.T. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. *Food Chemistry*. 2008. V. 106 (2). P. 816–819.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.007>
- Galvao J., Davis B., Tilley M. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*. 2014. V. 28 (3). P. 1317–1330.  
<https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G. et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natnl Acad. Sci.* 2002. V. 99 (25). P. 15898–15903.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.252637799>
- Gąsecka M., Magdziak Z., Siwulski M. et al. Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. *European Food Res. Technol.* 2018. V. 244. P. 259–268.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-017-2952-9>
- González A., Atienza V., Montoro A. et al. Use of *Ganoderma lucidum* (*Ganodermataceae*, *Basidiomycota*) as radioprotector. *Nutrients*. 2020. V. 12 (4).  
<https://doi.org/10.3390/nu12041143>
- Gregori A., Švagelj M., Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol. Biotechnol.* 2007. V. 45 (3). P. 238–249.
- Hoffmann P. Cryopreservation of fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1991. V. 7 (1). P. 92–94.  
<https://doi.org/10.1007/BF02310923>
- Homolka L. Methods of cryopreservation in Fungi. In: V.K. Gupta etc. (eds). *Laboratory protocols in fungal biology: Current methods in fungal biol.* Springer, N.Y., 2013. P. 9–16.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_2)
- Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes – Recent methods. *Fungal Biol.* 2014. V. 118 (2). P. 107–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>
- Homolka L., Lisá L. Long-term maintenance of Fungal Cultures on Perlite in Cryovials – an Alternative for Agar Slants. *Folia Microbiologica*. 2008. V. 53 (6). P. 534–536.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-008-0084-0>
- Homolka L., Lisá L., Eichlerová I. et al. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. *J. Microbiol. Methods*. 2001. V. 47 (3). P. 307–313.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00338-4)
- Homolka L., Lisa L., Kubátová A. et al. Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite. *Folia Microbiologica*. 2007. V. 52 (2). P. 153–157.  
<https://doi.org/10.1007/BF02932154>
- Homolka L., Lisá L., Nerud F. Basidiomycete cryopreservation on perlite: Evaluation of a new method. *Cryobiology*. 2006. V. 52 (3). P. 446–453.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.02.003>
- Homolka L., Lisá L., Nerud F. Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: comparison of two different freezing protocols. *Folia Microbiologica*. 2003. V. 48 (2). P. 219–226.  
<https://doi.org/10.1007/bf02930959>

- Hu Z., Du R., Xiu L. et al. Protective effect of triterpenes of *Ganoderma lucidum* on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and acute liver injury. *Cytokine*. 2020. V. 127. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154917>
- Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003. V. 46 (3). P. 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Hubálek Z., Kocková-Kratochvilová A. Liquid nitrogen storage of yeast cultures I. Survival, and literature review of the preservation of fungi at ultralow temperatures. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1978. V. 44 (2). P. 229–241. <https://doi.org/10.1007/BF00643225>
- Humber R.A. Fungi: preservation of cultures. In: L.A. Lacey (ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Acad. Press, 1997. P. 269–279. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50015-4>
- Hwang S.W. Effects of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia*. 1960. V. 52 (3). P. 527–529. <https://doi.org/10.2307/3755974>
- Hwang S.W. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Appl. Microbiol.* 1966. V. 14 (5). P. 784–788. <https://doi.org/10.1128/am.14.5.784-788.1966>
- Hwang S.W. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. An evaluation of liquid-nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia*. 1968. V. 60 (3). P. 613–621. <https://doi.org/10.1080/00275514.1968.12018610>
- Ito T., Nakagiri A. Viability of frozen cultures of basidiomycetes after fifteen-year storage. *Microbiology and Culture Collections*. 1996. V. 12 (2). P. 67–78.
- Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Yeremina S.S. et al. Experience in using modern methods of long-term storage of mushrooms in the All-Russian Collection of Microorganisms. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2010. V. 44 (1). P. 19–30 (in Russ.).
- Jahani M., Noroznezhad F., Mansouri K. Arginine: Challenges and opportunities of this two-faced molecule in cancer therapy. *Biomed. Pharmacotherapy*. 2018. V. 102. P. 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.109>
- Jiang M., Zhu M., Wang L. et al. Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomed. Pharmacotherapy*. 2019. V. 120. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109506>
- Johnson G.C., Martin A.K. Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Can. J. Microbiol.* 1992. V. 38 (8). P. 861–864. <https://doi.org/10.1139/m92-140>
- Jong S.C., Birmingham J.M. Cultivation and Preservation of Fungi in Culture. In: D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin, P.A. Lemke (eds). *The Mycota*, volume 7B. Systematics and Evolution. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, pp. 193–202.
- Jorge J.A., Polizeli M.D.L.T.M., Thevelein J.M. et al. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 1997. V. 154 (2). P. 165–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12639.x>
- Kalač P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J. Sci. Food Agric.* 2012. V. 93 (2). P. 209–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Karlsson J.O., Cravalho E.G., Borel Rinke I.H. et al. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. *Biophysical J.* 1993. V. 65 (6). P. 2524–2536. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81319-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81319-5)
- Khan M.A., Tania M. Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: An overview. *Food Reviews International*. 2012. V. 28 (3). P. 313–329. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.637267>
- Kim J.Y., Woo E.E., Lee I.K. et al. New antioxidants from the culture broth of *Hericium coralloides*. *J. Antibiotics*. 2018. V. 71. P. 822–825. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0067-6>
- Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S. et al. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*. 2002. V. 43. P. 143–149. <https://doi.org/10.1007/s102670200021>
- Kolesnikov A.I., Li J., Parker F., Eccleston R.S. et al. Vibrational dynamics of amorphous ice. *Physical Review B*. 1999. V. 59 (5). <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.59.3569>
- Kolkowski J.A., Smith D. Cryopreservation and freeze-drying of Fungi. In: J.G. Day, M.R. McLellan (eds.). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Methods in Molecular Biology, V. 38. Humana Press, N.J., 1995, pp. 49–61. <https://doi.org/10.1385/0-89603-296-5:49>
- Kowieska A., Lubowicki R., Jaskowska I. Chemical composition and nutritional characteristics of several cereal grain. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*. 2011. V. 10 (2). P. 37–50.
- Kulikova N.A., Klein O.I., Pivchenko D.V. et al. Oil degradation by basidiomycetes in soil and peat at low temperatures. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52 (6). P. 629–637. <https://doi.org/10.1134/S0003683816060119>
- Lalaymia I., Cranenbrouck S., Declerck S. Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2014. V. 24. P. 323–337. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0541-8>
- Lee J.K., Park K.S., Park S. et al. An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (2). P. 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.01.002>
- Leibo S.P. Cryobiology: Preservation of mammalian embryos. In: J.W. Evans, A. Hollaender, C.M. Wilson (eds). *Genetic engineering of animals, an agricultural perspective*. Springer, N.Y., 1986, pp. 251–272. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5110-8\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5110-8_21)
- Li C.H., Chen P.Y., Chang U.M. et al. Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sciences*. 2005. V. 77 (3). P. 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.045>
- Li I.C., Lee L.Y., Tzeng T.T. et al. Neurohealth properties of *Hericium erinaceus* mycelia enriched with erinacines. *Behavioural Neurology*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5802634>
- Linde G.A., Luciani A., Lopes A.D. et al. Long-term cryopreservation of basidiomycetes. *Brazilian J. Microbiol.*

2018. V. 49 (2). P. 220–231.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.004>
- Liu B., Liu J., Ju M. et al. Bacteria-white-rot fungi joint remediation of petroleum-contaminated soil based on sustained-release of laccase. RSC Advances. 2017. V. 7 (62). P. 39075–39081.  
<https://doi.org/10.1039/C7RA06962F>
- Liu J., Du C., Wang Y. et al. Anti-fatigue activities of polysaccharides extracted from *Hericium erinaceus*. Experimental and Therapeutic Medicine. 2015. V. 9 (2). P. 483–487.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2014.2139>
- Liu J., Jia L., Kan J. et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). Food and Chemical Toxicology. 2013. V. 51. P. 310–316.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.014>
- Liu X., Yuan J.P., Chung C.K. et al. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. Cancer Letters. 2002. V. 182 (2). P. 155–161.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00080-0)
- Lladó S., Covino S., Solanas A.M. et al. Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. J. Hazardous Materials. 2013. V. 248. P. 407–414.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.020>
- Lodge D.J., Ammirati J.F., O'Dell T.E. et al. Terrestrial and lignicolous macrofungi. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds). Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, 1st edn. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004, pp. 127–172.  
<https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50011-8>
- Lovelock J.E. Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochimica et Biophysica Acta. 1953a. V. 11. P. 28–36.  
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90005-5)
- Lovelock J.E. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochimica et Biophysica Acta. 1953b. V. 10. P. 414–426.  
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90273-X](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90273-X)
- Ma G., Yang W., Mariga A.M. et al. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. Carbohydrate Polymers. 2014. V. 114. P. 297–305.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.069>
- Ma H.T., Hsieh J.F., Chen S.T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry. 2015. V. 114. P. 109–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.017>
- MacGregor W.S. The chemical and physical properties of DMSO. Annls N.Y. Acad. Sci. 1967. V. 141 (1). P. 3–12.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34860.x>
- Mahmud S.A., Nagahisa K., Hirasawa T. et al. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 2009. V. 26 (1). P. 17–30.  
<https://doi.org/10.1002/yea.1646>
- Maia S.C., Toledo R.C.C., Almeida A.P.M.M. et al. Low-cost and low maintenance preservation of *Agaricus brasiliensis* cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. P. 2411–2416.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1050-1>
- Mandumpal J.B., Kreck C.A., Mancera R.L. A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. Physical Chemistry Chemical Physics. 2011. V. 13. P. 3839–3842.  
<https://doi.org/10.1039/C0CP02326D>
- Mantovani T.R.D., Tanaka H.S., Umeo S.H. et al. Cryopreservation at –20 and –70°C of *Pleurotus ostreatus* on grains. Indian J. Microbiol. 2012. V. 52 (3). P. 484–488.  
<https://doi.org/10.1007/s12088-012-0289-4>
- Marco-Urrea E., Aranda E., Caminal G. et al. Induction of hydroxyl radical production in *Trametes versicolor* to degrade recalcitrant chlorinated hydrocarbons. Biore-source Technology. 2009. V. 100 (23). P. 5757–5762.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.078>
- Marco-Urrea E., Gabarell X., Sarrà M. et al. Novel aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Environmental Sci. Technol. 2006. V. 40 (24). P. 7796–7802.  
<https://doi.org/10.1021/es0622958>
- Marsola S.J., Jorge L.F., Meniqueti A.B. et al. Endophytic fungi of *Brunfelsia uniflora*: isolation, cryopreservation, and determination of enzymatic and antioxidant activity. World J. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 38 (6).  
<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03278-5>
- Mason B.J., Bryant G.W., Van den Heuvel A.P. The growth habits and surface structure of ice crystals. Philosophical Magazine. 1963. V. 8 (87). P. 505–526.  
<https://doi.org/10.1080/14786436308211150>
- Mata G., Estrada A.E.R. Viability in spawn stocks of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*, after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. J. Agricultural Technol. 2005. V. 1. P. 153–162.
- Mata G., Pérez-Merlò R. Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. Cryobiology. 2003. V. 47 (1). P. 14–20.  
[https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00064-6)
- Mattila P., Könkö K., Eurola M. et al. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. J. Agric. Food Chemistry. 2001. V. 49 (5). P. 2343–2348.  
<https://doi.org/10.1021/jf001525d>
- Mazur P. A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. Cryobiology. 2010. V. 60 (1). P. 4–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.12.001>
- Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. The Journal of General Physiology. 1963. V. 47 (2). P. 347–369.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>
- Mazur P., Rall W.F., Leibo S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Cell Biophysics. 1984. V. 6. P. 197–213.  
<https://doi.org/10.1007/BF02788619>
- Mazur P., Schneider U., Mahowald A.P. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. Cryobiology. 1992. V. 29 (1). P. 39–68.  
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90005-M](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90005-M)
- McGinnis M.R., Padhye A.A., Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic *Actinomycetes* in sterile distilled water. Appl. Microbiol. 1974. V. 28 (2). P. 218–222.  
<https://doi.org/10.1128/am.28.2.218-222.1974>
- Momose Y., Matsumoto R., Maruyama A. et al. Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer

- tolerance to freeze-thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (3). P. 245–261.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.01.001>
- Morris G.J., Smith D., Coulson G.E. A Comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. *Microbiology*. 1988. V. 134 (11). P. 2897–2906.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-134-11-2897>
- Mueller G.M., Schmit J.P., Leacock P.R. et al. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation*. 2007. V. 16. P. 37–48.  
<https://doi.org/10.1007/s10531-006-9108-8>
- Muszyńska B., Kała K., Rojowski J. et al. Composition and Biological Properties of *Agaricus bisporus* Fruiting Bodies – a Review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 2017. V. 67 (3). P. 173–181.  
<https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0032>
- Nagano M., Shimizu K., Kondo R. et al. Reduction of depression and anxiety by 4 weeks *Hericium erinaceus* intake. *Biomedical Res.* 2010. V. 31 (4). P. 231–237.  
<https://doi.org/10.2220/biomedres.31.231>
- Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S.C. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds). *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*, 1st ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004, pp. 37–47.
- Ntougias S., Baldrian P., Ehaliotis C. et al. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresource Technol.* 2015. V. 189. P. 121–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149>
- Olien C.R., Smith M.N. Extension of localized freeze injury in barley by acute post-thaw bacterial disease. *Cryobiology*. 1981. V. 18 (4). P. 404–409.  
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(81\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0011-2240(81)90114-0)
- Onions A.H.S. Preservation of Fungi. In: C. Booth (ed.). *Methods in microbiology*. V. 4. Academic Press, L., 1971, pp. 113–151.  
[https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(09\)70009-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(09)70009-1)
- Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A. et al. Long-term preservation of fungal cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM): Protocols and results. In: V.K. Gupta et al. (eds.). *Laboratory protocols in fungal biology: Current methods in fungal biol.* Springer, N.Y., 2013, pp. 17–65.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_3)
- Palacio A., Gutiérrez Y., Rojas D. et al. Viability of basidiomycete fungal strains under different conservation methods: cryopreservation vs. freeze-drying processes. *Actualidades Biológicas*. 2014. V. 36 (100). P. 13–21.
- Panoff J.M., Thamavongs B., Guéguen M. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze–thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*. 2000. V. 40 (3). P. 264–269.  
<https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2240>
- Patel Y., Narayan R., Singh V.K. Medicinal Properties of *Pleurotus* species (Oyster Mushroom): A review. *World J. Fungal Plant Biol.* 2012. V. 3 (1). P. 1–12.
- Patist A., Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005. V. 40 (2). P. 107–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.003>
- Pegg D.E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (3). P. 36–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003>
- Perrin P.W. Long-term storage of cultures of wood-inhabiting fungi under mineral oil. *Mycologia*. 1979. V. 71 (4). P. 867–869.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021086>
- Pillai T.G., Nair C.K.K., Janardhanan K.K. Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 2008. V. 26 (1). P. 80–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.02.004>
- Pozdnyakova N.N., Nikitina V.E., Turovskaya O.V. Bioremediation of oil-polluted soil with an association including the fungus *Pleurotus ostreatus* and soil microflora. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2008. V. 44 (1). P. 60–65.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683808010109>
- Purtseva N.V., Kiyashko A.A., Senik S.V. Basidial fungi of the Botanical Garden of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences in pure culture. In: *Botany: history, theory, practice (on the occasion of the 300th anniversary of the founding of the V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences): Proceedings of the International Scientific Conference*. SPb., 2014, p. 260 (in Russ.).
- Purnomo A.S., Mori T., Takagi K., Kondo R. Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 2011. V. 65 (5). P. 691–695.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.004>
- Rai R.D. Production of Edible Fungi. In: D.K. Arora, P.D. Bridge, D. Bhatnagar (eds). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. Marcel Dekker, Inc., N.Y., 2004, pp. 382–404.
- Rammler D.H., Zaffaroni A. Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. *Annals of the N.Y. Academy of Sciences*. 1967. V. 141 (1). P. 13–23.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34861.x>
- Randhawa M.A. Dimethyl sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and the arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2008. V. 49 (2). P. 125–128.  
<https://doi.org/10.3314/jjmm.49.125>
- Reid I.D., Paice M.G. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol. Reviews*. 1994. V. 13 (2–3). P. 369–375.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00056.x>
- Ribeiro M.J.S., Leão L.S.C., Morais P.B. et al. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999. V. 75 (3). P. 245–251.  
<https://doi.org/10.1023/a:1001806012566>
- Richter D.L. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 20 years in cold storage in sterile water. *Can. J. Microbiol.* 2008. V. 54. P. 595–599.  
<https://doi.org/10.1139/W08-049>
- Richter D.L., Dixon T.G., Smith J.K. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 30 years in cold storage in sterile water. *Can. J. Microbiol.* 2016. V. 62. P. 932–937.  
<https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0272>

- Richter D.L., Kangas L.C., Smith J.K. et al.* Comparison of effectiveness of wood decay fungi maintained by annual subculture on agar and stored in sterile water for 18 years. *Can. J. Microbiol.* 2010. V. 56. P. 268–271. <https://doi.org/10.1139/W10-001>
- Rodríguez-Rodríguez C.E., Castro-Gutiérrez V., Chin-Pampilo J.S. et al.* On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. *FEMS Microbiology Letters.* 2013. V. 345 (1). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12161>
- Rosales E., Pazos M., Ángeles Sanromán M.* Feasibility of solid-state fermentation using spent fungi-substrate in the biodegradation of PAHs. *CLEAN – Soil, Air, Water.* 2013. V. 41 (6). P. 610–615. <https://doi.org/10.1002/clen.201100305>
- Rubinsky B., Pegg D.E., Calne R.Y.* A mathematical model for the freezing process in biological tissue. *Proc. Royal Soc. London. Ser. B. Biol.* 1988. V. 234 (1276). P. 343–358. <https://doi.org/10.1098/rspb.1988.0053>
- Ryan M.J., Smith D.* Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. In: *J.G. Day, G.N. Stacey* (eds). *Cryopreservation and freeze-drying protocols.* Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, 2007. P. 127–140. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_9)
- Saharan R.K., Sharma S.C.* Correlation studies of trehalose with oxidative stress in ethanol stressed yeast *Pachysolen tannophilus*. *Current Res. J. Biol. Sci.* 2010. V. 2 (5). P. 300–305.
- Sakurai K., Yuasa M., Ohji S. et al.* Gene mutations in *Ganoderma lucidum* during long-term preservation by repeated subculturing. *Biopreservation and Biobanking.* 2019. V. 17 (5). P. 395–400. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0149>
- Salzmann C.G., Loveday J.S., Rosu-Finsen A. et al.* Structure and nature of ice XIX. *Nature Communications.* 2021. V. 12. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23399-z>
- Samšňáková A., Kálalová S.* The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebrate Pathol.* 1983. V. 42 (2). P. 156–161. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90057-5)
- Sánchez C.* Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Advances.* 2009. V. 27 (2). P. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K. et al.* *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnol.* 2009. V. 10 (8). P. 717–742. <https://doi.org/10.2174/138920109789978757>
- Sato M., Inaba S., Noguchi M. et al.* Vermiculite as a culture substrate greatly improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Fungal Biol.* 2020. V. 124 (8). P. 742–751. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.05.002>
- Sato M., Inaba S., Sukenobe J. et al.* A modified perlite protocol with a mixed dimethyl sulfoxide and trehalose cryoprotectant improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Mycologia.* 2019. V. 111 (1). P. 161–176. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1520035>
- Sato M., Sukenobe J., Nakagiri A.* Cryopreservation of cryo-sensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. *CryoLetters.* 2012. V. 33 (2). P. 86–94.
- Sehgal O.P., Das P.D.* Effect of freezing on conformation and stability of the virions of southern bean mosaic virus. *Virology.* 1975. V. 64 (1). P. 180–186. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90090-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90090-2)
- Semwal D.K., Semwal R.B., Combrinck S. et al.* Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients.* 2016. V. 8 (2). <https://doi.org/10.3390/nu8020090>
- Singh S.K., Baghela A.* Cryopreservation of microorganisms. In: *A. Varma, A.K. Sharma* (eds). *Modern tools and techniques to understand microbes.* Springer, Cham, 2017, pp. 321–333. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_21)
- Singh S.K., Singh P.N., Gaikwad S.B. et al.* Conservation of Fungi: A review on conventional approaches. In: *S.K. Sharma, A. Varma* (eds). *Microbial resource conservation: Conventional to modern approaches.* Springer, Cham, 2018, pp. 223–237. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_8)
- Singh S.K., Upadhyay R.C., Kamal S. et al.* Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. *CryoLetters.* 2004a. V. 25 (1). P. 23–32.
- Singh S.K., Upadhyay R.C., Yadav M.C. et al.* Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Sci.* 2004b. V. 87 (5). P. 568–570.
- Smina T.P., Joseph J., Janardhanan K.K.* *Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent  $\gamma$ -radiation induced oxidative stress in Swiss albino mice in vivo. *Redox Report.* 2016. V. 21 (6). P. 254–261. <https://doi.org/10.1080/13510002.2015.1126098>
- Smith D.* The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi. *CryoLetters.* 1998. V. 19 (2). P. 79–90.
- Smith D., Onions A.H.S.* A comparison of some preservation techniques for fungi. *Trans. British Mycol. Soc.* 1983. V. 81 (3). P. 535–540. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80122-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80122-3)
- Smith D., Thomas V.E.* Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 14. P. 49–57. <https://doi.org/10.1023/A:1008820432471>
- Sodeyama K., Sakka Y., Kamino Y. et al.* Preparation of fine expanded perlite. *J. Materials Sci.* 1999. V. 34. P. 2461–2468. <https://doi.org/10.1023/A:1004579120164>
- Šramková Z., Gregová E., Šturdík E.* Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca.* 2009. V. 2 (1). P. 115–138.
- Stalpers J.A., Hoog A., Vlug I.J.* Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. *Mycologia.* 1987. V. 79 (1). P. 82–89. <https://doi.org/10.2307/3807747>
- Stebbins M.E., Robbins W.J.* Mineral oil and preservation of fungous cultures. *Mycologia.* 1949. V. 41 (6). P. 632–636. <https://doi.org/10.1080/00275514.1949.12017806>

- Stielow J.B., Vaas L.A.I., Göker M. et al.* Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic *Basidiomycota* and *Ascomycota*. *Mycologia*. 2012. V. 104 (1). P. 324–330. <https://doi.org/10.3852/11-155>
- Stoychev I., Homolka L., Nerud G. et al.* Activities of ligninolytic enzymes in some white-rot basidiomycete strains after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998. V. 73. P. 211–214. <https://doi.org/10.1023/A:1000837719510>
- Sundari S.K., Adholeya A.* Freeze-drying vegetative mycelium of *Laccaria fraterna* and its subsequent regeneration. *Biotechnology Techniques*. 1999. V. 13. P. 491–495. <https://doi.org/10.1023/A:1008937719759>
- Sundari S.K., Adholeya A.* Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000a. V. 16 (4). P. 373–376. <https://doi.org/10.1023/A:1008984700163>
- Sundari S.K., Adholeya A.* Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates: part II. Enzymes acting upon carbon compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000b. V. 16 (8). P. 865–868. <https://doi.org/10.1023/A:1008921419630>
- Tan C.S., van Ingen C.W., Stalpers J.A.* Freeze-drying of fungal hyphae and stability of the product. In: *L.J.L.D. van Griensven* (ed.). *Genetics and Breeding of Agaricus*. Pudoc, Wageningen, 1991, pp. 25–30.
- Tan M., Mei J., Xie J.* The formation and control of ice crystal and its impact on the quality of frozen aquatic products: A review. *Crystals*. 2021. V. 11 (1). <https://doi.org/10.3390/cryst11010068>
- Tanaka H.S., Mantovani T.R.D., dos Santos M.P. et al.* Cereal grains and glycerol in *Agaricus blazei* cryopreservation. *Biosci. J.* 2013. V. 29 (3). P. 627–633.
- Tang W., Liu J.W., Zhao W.M. et al.* Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences*. 2006. V. 80 (3). P. 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.09.001>
- Tao D., Li P.H.* Classification of plant cell cryoprotectants. *J. Theoretical Biology*. 1986. V. 123 (3). P. 305–310. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80245-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80245-4)
- Tchounwou C.K., Yedjou C.G., Farah I. et al.* D-glucose-induced cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects on human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. *J. Cancer Sci. Therapy*. 2014. V. 6 (5). P. 156–160. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000265>
- Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R.* The influence of various thermal effects on the composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in filamentous fungi. *Mikrobiologiya*. 2011. V. 80 (4). P. 447–453 (in Russ.).
- Tesouro M., Mazzotta F.A.* Pathophysiology of diabetes. In: *G. Orlando et al.* (eds.). *Transplantation, bioengineering, and regeneration of the endocrine pancreas*. V. 1. Elsevier Academic Press, Amsterdam etc., 2020. P. 37–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814833-4.00003-4>
- Tomizawa M.M., Dias E.S., de Assis L.J. et al.* Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei* using markers RAPD. *Ciência e Agrotecnologia*. 2007. V. 31 (4). P. 1242–1249. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000400045>
- Turkovskaya O.V., Pozdnyakova N.N.* Features of the use of mushrooms in environmental biotechnologies. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2018. V. 3 (5). P. 60–66 (in Russ.).
- Турке В.* The  $r_s$  structure of DMSO, revisited. *J. Molecular Structure*. 1996. V. 384 (1). P. 35–40. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(96\)09313-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(96)09313-1)
- Vetter J.* Biological values of cultivated mushrooms – a review. *Acta Alimentaria*. 2019. V. 48 (2). P. 229–240. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.2.11>
- Voyron S., Roussel S., Munaut F. et al.* Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycol. Res.* 2009. V. 113 (10). P. 1027–1038. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>
- Wang J.C., Hu S.H., Wang J.T. et al.* Hypoglycemic effect of extract of *Hericium erinaceus*. *J. Sci. Food Agric.* 2005. V. 85 (4). P. 641–646. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1928>
- Wang Z., Luo D., Liang Z.* Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. *Carbohydrate Polymers*. 2004. V. 57 (3). P. 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.018>
- Wasser S.P., Weis A.L.* Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *Int. J. Medicinal Mushrooms*. 1999. V. 1 (1). <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.30>
- Wessels J.G.H.* Fruiting in the higher fungi. *Advances Microbial Physiol.* 1993. V. 34. P. 147–202. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60029-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60029-6)
- Whalley E., Klug D.D., Handa Y.P.* Entropy of amorphous ice. *Nature*. 1989. V. 342. P. 782–783. <https://doi.org/10.1038/342782a0>
- Wolfe J., Bryant G.* Freezing, Drying, and/or vitrification of membrane–solute–water systems. *Cryobiology*. 1999. V. 39 (2). P. 103–129. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2195>
- Wolkers W.F., Oldenhof H.* Principles underlying cryopreservation and freeze-drying of cells and tissues. In: *W.F. Wolkers, H. Oldenhof* (eds). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press, N.Y., 2021, pp. 3–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_1)
- Xia J., Dai L., Wang L. et al.* Ganoderic acid DM induces autophagic apoptosis in non-small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR activity. *Chemico-Biological Interactions*. 2020. V. 316. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108932>
- Xiao N., Suzuki K., Nishimiya Y. et al.* Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishiikariensis*. *The FEBS Journal*. 2010. V. 277 (2). P. 394–403. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07490.x>
- Yang Z., Xu J., Fu Q. et al.* Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydrate Polymers*. 2013. V. 95 (2). P. 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.024>



- Young D., Rice J., Martin R. et al.* Degradation of bunker C fuel oil by white-rot fungi in sawdust cultures suggests potential applications in bioremediation. *PIOS One*. 2015. V. 10 (6).  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130381
- Zaghi L.L., Bertéli M.B.D., de Freitas J.D.S. et al.* Five-year cryopreservation at  $-80^{\circ}\text{C}$  of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique. *J. Microbiol. Methods*. 2020. V. 176.  
https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106030
- Zaghi L.L. Jr., Lopes A.D., Cordeiro F.A. et al.* Cryopreservation at  $-75^{\circ}\text{C}$  of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose. *Brazilian J. Microbiol.* 2018. V. 49 (2). P. 370–377.  
https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.003
- Zanaroli G., Di Toro S., Todaro D. et al.* Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories*. 2010. V. 9.  
https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-10
- Zhang Y., Geng W., Shen Y. et al.* Edible mushroom cultivation for food security and rural development in China: Bio-innovation, technological dissemination and marketing. *sustainability*. 2014. V. 6 (5). P. 2961–2973.  
https://doi.org/10.3390/su6052961
- Zhao L., Dong Y., Chen G. et al.* Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 2010. V. 80 (3). P. 783–789.  
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029
- Zhu C., Gao Y., Zhu W. et al.* Computational prediction of novel ice phases: A perspective. *J. Phys. Chem. Letters*. 2020. V. 11 (17). P. 7449–7461.  
https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c01635
- Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Еремина С.С. и др.* (Ivanushkina et al.) Опыт использования современных методов длительного хранения грибов во Всероссийской коллекции микроорганизмов // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. № 1. С. 19–30.
- Псурцева Н.В., Кияшко А.А., Сенник С.В.* (Psuritseva et al.) Базидиальные грибы Ботанического сада Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН в чистой культуре // Ботаника: история, теория, практика (к 300-летию основания Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук): Труды международной научной конференции. 2014. 260 с.
- Терешина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р.* (Tereshina et al.) Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 447–453.
- Турковская О.В., Позднякова Н.Н.* (Turkovskaya, Pozdnyukova) Особенности использования грибов в экологических биотехнологиях // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. Т. 3. № 5. С. 60–66.

## Methods for Long-Term Storage of Pure Cultures of Macrofungi

N. S. Komissarov<sup>a,#</sup>, M. Yu. Dyakov<sup>a,##</sup>, and L. V. Garibova<sup>a,###</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

<sup>#</sup>e-mail: macoloams@gmail.com

<sup>##</sup>e-mail: max\_fungi@mail.ru

<sup>###</sup>e-mail: gariblv@yandex.ru

Basidiomycetous macrofungi have significant biotechnological potential and are promising objects for use in various industrial sectors, such as food production, pharmaceuticals, the production of active compounds and polysaccharides. The industrial use of macrofungi implies the presence of large collections of cultures using storage protocols that ensure the preservation of viability, reproduction, genetic stability and the ability to produce active compounds. With the expansion of the list of industrially used species, it is advisable to develop new protocols for the storage of strains and optimize the existing ones for new, promising types of macrofungi. It seems necessary to study in detail the effect of long periods of storage on morphological and cultural characteristics, genetic stability, enzymatic activity, and the ability to form sexual structures.

**Keywords:** basidiomycetes, cryopreservation, cryoprotectant, lyophilization, macrofungi