

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ  
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ІВАНОВА ТЕТЯНА СЕРГІЇВНА**

УДК 582.284+582.282: 577.1:664.76

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**БІОТЕХНОЛОГІЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ  
НА ВІДХОДАХ ПЕРЕРОБЛЕННЯ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 Іванова Т. С.

Науковий керівник: Бісько Ніна Анатоліївна, доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Київ – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Іванова Т. С.* Біотехнологія культивування лікарських макроміцетів на відходах перероблення зернових культур. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню біотехнологічного процесу культивування лікарських макроміцетів на рідких живильних середовищах із продуктами перероблення зернових культур, біохімічного складу вихідних субстратів та отриманої біомаси з біологічно активними речовинами.

Проведений скринінг лікарських макроміцетів на рідких живильних середовищах з новими субстратами – аспіраційними відходами ячменю, відходами млина III-ої категорії, сухарній крихті, осаді післяспиртової барди кукурудзи та багасі сорго – виявив біотехнологічно ефективні види для максимального накопичення біомаси. Проаналізований хімічний склад досліджуваних субстратів для культивування макроміцетів: вміст волості, зольності, сирого протеїну, сирого жиру та вуглеводів. Розрахована ефективність біоконверсії субстрату міцелієм грибів. Показано, що найбільше накопичення біомаси та найвища ефективність біоконверсії субстрату забезпечувала сухарна крихта при поверхневому культивуванні *Schizophyllum commune* IBK 1768, *Trametes versicolor* IBK 353, *Flammulina velutipes* IBK 1878, та *Ganoderma lucidum* IBK 1900 (до 9 г/дм<sup>3</sup> та 39 % відповідно).

Розроблено схему біотехнологічного процесу глибинного культивування лікарських макроміцетів. Вона включає стерилізування живильного середовища, приготування глибинно культивованого посівного

матеріалу для елімінування лаг-фази, параметри для культивування культур, відокремлення та попередню підготовку міцелію та культуральної рідини для хімічних досліджень. Розроблена схема глибинного культивування макроміцетів дозволяє класифікувати наведений у роботі біотехнологічний процес:

- ✓ за характеристикою біологічного агенту – клітини еукаріот;
- ✓ за числом біологічних агентів – один (чиста культура продуцента);
- ✓ за умовами проведення процесу – стерильний, аеробний, глибинний, періодичний, рідинний, багатоступеневий;
- ✓ за стадією реалізації технології виробництва – 4-та стадія (виділення, очищення, сушіння);
- ✓ за цільовим продуктом – клітинна біомаса, що містить комплекс біологічно активних речовин;
- ✓ за механізмом утворення кінцевого продукту – біосинтез.

Визначені оптимальні концентрації сухарної крихти для досягнення максимальної ефективності біоконверсії субстрату: 40 г/дм<sup>3</sup> для *G. lucidum* IBK 1900, 50 г/дм<sup>3</sup> – для *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353, а також 60 г/дм<sup>3</sup> – для *S. commune* IBK 1768.

В результаті дослідження динаміки глибинного культивування міцелію були визначені періоди культивування для максимального накопичення біомаси та ефективності біоконверсії субстрату: 4 доби для *S. commune* IBK 1768, 5 діб для *T. versicolor* IBK 353, а також 7 діб для *G. lucidum* IBK 1900 та *F. velutipes* IBK 1878. При глибинному культивуванні на сухарній крихті *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 накопичували значну біомасу (до  $24,0 \pm 0,8$  г/дм<sup>3</sup> та  $15,8 \pm 0,5$  г/дм<sup>3</sup> відповідно). Значення рН культуральної рідини знижувалось від початкового значення для живильного середовища (6,0) до 3,6-5,3 з найменшими значеннями в точках накопичення максимальної біомаси, що може бути пов'язано з утворенням органічних кислот.

Найбільша швидкість росту міцелію спостерігалась до 3-ої доби культивування культур, у фазі активного росту. Відсутність росту констатувалась з 5-ої доби для *S. commune* IBK 1768, з 7-ої доби для *T. versicolor* IBK 353, а також з 10-ої доби для *G. lucidum* IBK 1900 та *F. velutipes* IBK 1878. Найвища швидкість та продуктивність біосинтезу ендополісахаридів та білку спостерігалась у фазі активного росту (від початку культивування до 2-ої – 3-ої доби глибинного культивування на сухарній крихті).

Результати хімічного аналізу виявили, що на 4-ту добу глибинного культивування на сухарній крихті міцеліальна маса *S. commune* IBK 1768 містить 18,83 % білків, 3,45 % жирів, 66,06 % вуглеводів (з яких 6,79 % – ендополісахариди). Біомаса *T. versicolor* IBK 353 на 5-ту добу глибинного культивування на сухарній крихті містить 19,85 % білків, 2,35 % жирів, 62,24 % вуглеводів (з яких 6,10 % – ендополісахариди). Розрахована енергетична цінність міцелію макроміцетів при глибинному культивуванні на сухарній крихті: 331,89 кКал на 100 г висушеної біомаси *S. commune* IBK 1768 та 314,38 кКал на 100 г висушеної біомаси *T. versicolor* IBK 353.

Вважається, що білок має високу харчову цінність, якщо вміст незамінних амінокислот перевищує 40 %. Згідно до наших досліджень, білок *S. commune* IBK 1768 має високу харчову цінність, оскільки відсоток незамінних амінокислот є вищим (41,40 %), а відсоток незамінних амінокислот у біомасі *T. versicolor* IBK 353 наближається до цього значення (37,38 %). Розрахунки хімічного скору показали, що біомаса *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 при глибинному культивуванні на сухарній крихті лімітована на ізолейцин (79,93 % та 54,23 % відповідно).

Розрахунки харчової цінності білку *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 показали, що індекси незамінних амінокислот становлять 79,22 % та 94,25 %, прогнозована біологічна цінність – 74,65 % та 91,03 %. Дослідження показали, що фракція жирних кислот біомаси *T. versicolor* IBK

353 та *S. commune* IBK 1768 при глибинному культивуванні на сухарній крихті характеризувалась високим вмістом ненасичених жирних кислот (60,45 % та 68,28 % від суми жирних кислот відповідно), найбільший відсоток серед них становили октадеценова та октадекадієнова жирні кислоти.

Було показано, що міцеліальна маса *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою містила вітаміни ніацин, тіамін, рибофлавін та фолієву кислоту – від 0,29 до 10,670 мг%. Сумарна кількість перерахованих вітамінів становила 9,74 мг% для *S. commune* IBK 1768 та 12,70 мг% для *T. versicolor* IBK 353. При цьому, у вихідному субстраті сухарній крихті сумарна кількість цих вітамінів була 1,28 мг%. Вміст кожного вітаміну достовірно збільшувався у біомасі грибів у порівнянні з контролем (субстратом): в 3-43 рази в залежності від вітаміну.

Отримані дані свідчать, що *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою проявляють подібну фізіологічну активність: найвищі показники пригнічення грибними екстрактами спостерігались щодо *P. vulgaris* ATCC 6896, якщо порівнювати з антимікробною активністю до *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027. та *C. albicans* ATCC 885-653; гемаглютинування еритроцитів людини нативними екстрактами міцелію достовірно не відрізнялось від контролю.

Таким чином, наукова новизна отриманих даних полягає у наступному. Вивчено закономірності впливу живильних середовищ з відходами перероблення зернових культур на утворення біомаси лікарськими макроміцетами. Рідкі живильні середовища для культивування міцелію макроміцетів, до складу яких входили: вода та один із таких субстратів, як сухарна крихта, аспіраційні відходи ячменю, відходи III-ої категорії млина, багаса сорго, барда кукурудзи, були застосовані вперше.

Досліджено особливості глибинного культивування *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900 на живильному середовищі з сухарною крихтою, підібрано оптимальні концентрації субстрату для максимальної ефективності біоконверсії. Розроблено спосіб приготування глибинно культивованого посівного матеріалу для уникнення лаг-фази.

Отримано біомасу високопродуктивних штамів *S. commune* IBK 1768 (24,0 г/дм<sup>3</sup>) та *T. versicolor* IBK 353 (15,8 г/дм<sup>3</sup>) при глибинному культивуванні на сухарній крихті. Біомаса грибів містить тіамін, рибофлавін, ніацин, фолати та виявляє антимікробну активність відносно *Proteus vulgaris* ATCC 6896, яка наближається до антимікробної дії антибіотику ампіциліну. Проаналізовано харчову та енергетичну цінність, жирнокислотний та амінокислотний профіль біомаси *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 в стаціонарній фазі росту культур при глибинному культивуванні на вперше застосованому живильному середовищі з сухарною крихтою. Вперше визначено вміст вітамінів групи В у міцелію *S. commune*.

Дисертаційна робота має практичне значення. Одержані дані дозволяють запропонувати використання відходів перероблення зернових культур України як компоненти нових за складом живильних середовищ для культивування біомаси лікарських макроміцетів на підприємствах з культивування грибів різної потужності. Відібрано *O. sinensis* IBK 1928, *G. applanatum* IBK 1701, *G. frondosa* IBK 976, *L. edodes* IBK 502 та *P. ostreatus* IBK 551, що перспективні для культивування на аспіраційних відходах ячменю, а також *C. militaris* IBK 1862, *G. lucidum* IBK 1900, *F. velutipes* IBK 1878, *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 – на сухарній крихті.

При глибинному культивуванні *S. commune* IBK 1768 на живильному середовищі з сухарною крихтою за 4 доби було отримано максимальну біомасу 24 г/дм<sup>3</sup>, що містила 41,40 % незамінних амінокислот від суми амінокислот (індекс незамінних амінокислот 94,25 %, прогнозована

біологічна цінність 91,03 %), а також 9,74 мг% сумарно тіаміну, рибофлавіну, ніацину та фолатів. Досліджена харчова та енергетична цінність міцелію *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353, отриманого при культивуванні на сухарній крихті, може бути використана для створення дієтичних добавок та новітніх харчових інгредієнтів.

Склад живильного середовища із сухарною крихтою для культивування міцелію лікарських грибів захищено патентом України на корисну модель № 98224 «Поживне середовище для культивування грибів».

Матеріали дисертаційної роботи (використання живильних середовищ на основі відходів перероблення зернових культур для культивування лікарських макроміцетів) впроваджено у навчальний процес на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського з дисципліни «Біотехнологія сільськогосподарських виробництв», кредитний модуль № 3 «Проектування та виробництво біотехнологічної продукції» при виконанні лабораторних робіт за темою «Переробка відходів сільського господарства з використанням біотехнології».

**Ключові слова:** лікарські макроміцети, відходи перероблення зернових культур, ефективність біоконверсії субстрату, глибинне культивування, біомаса, ендополісахариди, амінокислоти, жирні кислоти, вітаміни, антимікробна активність.

## SUMMARY

*Ivanova T.S. Biotechnology of Medicinal Mushroom Cultivation on the Wastes of Cereals Processing. – Manuscript.*

Thesis for Candidate degree in Biology, specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

The current thesis is dedicated to the investigation of biotechnological process of medicinal mushroom cultivation on liquid nutrient media with products of cereals processing, biochemical composition of initial substrates and obtaining of biomass with biologically active substances for creation of dietary substances and functional foods.

The results of screening of ten medicinal mushroom species on liquid media with new substrates (aspiration wastes of barley, III-d category waste of wheat and rye mill, breadcrumb, residue of corn stillage, and sorghum bagasse) have shown biotechnologically efficient species for maximal biomass accumulation. The chemical composition (moisture, ash, crude protein, crude fat, carbohydrate content) of substrates under study for macromycetes cultivation was analyzed. The bioconversion efficiency of substrates with fungal mycelium was calculated. It was demonstrated that the highest biomass accumulation and bioconversion efficiency provided breadcrumb in surface cultivation of *Schizophyllum commune* IBK 1768, *Trametes versicolor* IBK 353, *Flammulina velutipes* IBK 1878, and *Ganoderma lucidum* IBK 1900 (up to 9 g/dm<sup>3</sup> and 39 % correspondingly).

The scheme of biotechnological process of medicinal mushroom submerged cultivation was developed. It included sterilization of nutrient media, submerged cultivated inoculum preparation for elimination of lag phase, parameters for submerged cultivation of cultures, separation and pretreatment of mycelia and cultured broth for chemical analyzes. The developed scheme of macromycetes



submerged cultivation allows us to classify the biotechnological process presented in the work:

- ✓ according to the characteristics of the biological agent – eukaryotic cells;
- ✓ according to the number of biological agents – one (pure culture of the producer);
- ✓ according to the conditions of the process – sterile, aerobic, submerged, periodic, liquid, multi-stage;
- ✓ according to the stage of realization of production technology – the 4-th stage (isolation, purification, drying);
- ✓ according to the target product – cell biomass containing a complex of biologically active substances;
- ✓ according to the mechanism of formation of the final product – biosynthesis.

In order to achieve maximal bioconversion efficiency optimal breadcumb concentration in medium for submerged cultivation was revealed: 40 g/dm<sup>3</sup> for *G. lucidum* IBK 1900, 50 g/dm<sup>3</sup> for *T. versicolor* IBK 353 and *F. velutipes* IBK 1878 as well as 60 g/dm<sup>3</sup> for *S. commune* IBK 1768.

The dynamics of mycelia submerged cultivation defined periods for maximal biomass accumulation and bioconversion efficiency: the 4-th day for *S. commune* IBK 1768, the 5-th day for *T. versicolor* IBK 353, the 7-th day for *F. velutipes* IBK 1878 and for *G. lucidum* IBK 1900. In submerged cultivation on breadcrumb *S. commune* IBK 1768 and *T. versicolor* IBK 353 produced significant amounts of biomass (up to  $24.0 \pm 0.8$  g/dm<sup>3</sup> and  $15.8 \pm 0.5$  g/dm<sup>3</sup> accordingly). pH of cultured broth decreased from initial value of nutrient medium (6.0) to 3.6-5.3 with lowest meanings in the points of maximal biomass accumulation which can be associated with generation of organic acids.

The highest rates of mycelium growth were found to be before the 3-d day of cultivation for all fungal cultures, at the stage of active growth. The absence of growth was observed after 5 days of *S. commune* IBK 1768, 7 days of *T. versicolor* IBK 353, and 10 days of *F. velutipes* IBK 1878 and *G. lucidum* IBK 1900

submerged cultivation on breadcrumb. The highest rate and productivity of endopolysaccharide and protein biosynthesis were registered in the phase of active growth (from the begging of cultivation to the 2-nd-3-rd day of submerged cultivation on breadcrumb).

The chemical analysis revealed that on the 4-th day of submerged cultivation on breadcrumb *S. commune* IBK 1768 biomass contains 18.83 % protein, 3.45 % fat, 66.06 % carbohydrates (6.79 % of which endopolysaccharides). *T. versicolor* IBK 353 contain 19.85 % protein, 2.35 % fat, 62.24 % carbohydrates (6.10 % of which endopolysaccharides) on the 5-th day of submerged cultivation on breadcrumb.

It is considered that protein has a high nutritive value if essential amino acid percent exceeds 40 %. According to our investigations, *S. commune* IBK 1768 protein possesses high nutritive value because essential amino acids percent is higher than this value (41.40 %), at the same time essential amino acid percent in *T. versicolor* IBK 353 biomass verges towards this value (37.38 %). Amino acid chemical score calculations showed that *S. commune* IBK 1768 and *T. versicolor* IBK 353 biomasses in submerged cultivation on breadcrumb are limited in Isoleucine (79.93 % and 54.23 % correspondingly).

The study of *T. versicolor* IBK 353 and *S. commune* IBK 1768 protein nutritive value has shown that the Essential Amino Acid Indexes are 79.22 % and 94.25 %, Predicted Biological Values are 74.65 % and 91.03 %. The research revealed that fatty acid fraction of *T. versicolor* IBK 353 and *S. commune* IBK 1768 biomass in submerged cultivation on breadcrumb have high content of unsaturated fatty acids (60.45 % and 68.28 % from total fatty acids correspondingly), wherein the highest percent fell to the share of 18:1 and 18:2 fatty acids.

It was demonstrated that mycelial masses of *T. versicolor* IBK 353 and *S. commune* IBK 1768 in submerged cultivation on breadcrumb contained vitamins niacin, thiamine, riboflavin, and folates – from 0.29 to 10.67 mg%. Total amounts

of aforementioned vitamins were 9.74 mg% for *S. commune* IBK 1768 and 12.70 mg% for *T. versicolor* IBK 353. At the same time, in initial substrate breadcrumb the sum of these vitamins was 1.28 mg%. The content of each vitamin significantly increased in fungal biomass comparing to the control (substrate): 3-43 times depending on the vitamin.

Our findings have shown that *T. versicolor* IBK 353 and *S. commune* IBK 1768 cultivated in submerged conditions on breadcrumb exhibited similar physiological activity: the highest inhibition rates of fungal extracts were shown toward *P. vulgaris* ATCC 6896 comparing to antimicrobial activity towards *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, and *C. albicans* ATCC 885-653; human erythrocyte hemagglutination with crude mycelia extracts didn't significantly differ from control.

Thus, the scientific novelty of the obtained data is as follows. The influence of nutrient media with the wastes of cereal processing on the biomass synthesis by medicinal macromycetes was studied. The liquid nutrient media for the cultivation of macromycetes mycelia, which included: water and one of such substrates, as breadcrumb, aspiration wastes from barley, waste of the III-d grade of mill, sorghum bagasse, and corn stillage, were used for the first time.

The peculiarities of *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878, and *G. lucidum* IBK 1900 submerged cultivation on nutrient medium with breadcrumb were explored, and optimal concentrations of substrate for maximal bioconversion efficiency were selected. The method of preparation of submerged cultivated inoculum was developed for avoiding lag phase.

The biomass of highly productive strains of *S. commune* IBK 1768 (24.0 g/dm<sup>3</sup>) and *T. versicolor* IBK 353 (15.8 g/dm<sup>3</sup>) was obtained during submerged cultivation on breadcrumb. The fungal biomass comprised thiamine, riboflavin, niacin, folates and possesses antimicrobial activity against *Proteus vulgaris* ATCC 6896, which is close to the antimicrobial action of the antibiotic

ampicillin. The nutritional and energy values, the amino acid and fatty acid ratio of *T. versicolor* IBK 353 and *S. commune* IBK 1768 biomass were analysed in the stationary phase of growth in submerged cultivation on applied for the first time nutrient medium with breadcrumb. The content of B group vitamins in the *S. commune* mycelium was studied for the first time.

The thesis has practical value. The obtained data allow us to propose the use of cereal processing wastes of Ukraine as components of the nutrient media with new composition for the cultivation of medicinal macromycetes biomass at fungal cultivation enterprises of different capacities. *O. sinensis* IBK 1928, *G. applanatum* IBK 1701, *G. frondosa* IBK 976, *L. edodes* IBK 502, and *P. ostreatus* IBK 551 were chosen as perspective for cultivation on aspiration wastes from barley, as well as *C. militaris* IBK 1862, *G. lucidum* IBK 1900, *F. velutipes* IBK 1878, *T. versicolor* IBK 353, and *S. commune* IBK 1768 for cultivation on the breadcrumb.

In submerged cultivation of *S. commune* IBK 1768 on nutrient medium with breadcrumb the maximal biomass  $24 \text{ g/dm}^3$  was obtained for 4 days, which contained 41,40 % of essential amino acids from total amino acids (Essential Amino Acid Index is 94.25 %, Predicted Biological Values is 91.03 %) and 9.74 mg% a total of thiamine, niacin, riboflavin, and folates. The investigated nutritional and energy values of *S. commune* IBK 1768 and *T. versicolor* IBK 353 mycelia, which was obtained in cultivation on the breadcrumb, can be used to create dietary supplements and functional foods.

The obtained data allow us to propose the use of cereal processing wastes of Ukraine (breadcrumb – the waste of bread production, aspiration waste from barley – waste of beer production, waste of the third category of mills, as well as wastes of bioethanol production – sorghum bagasse and corn stillage) as new substrates for the cultivation of medicinal macromycetes biomass at enterprises of different capacities for cultivation of mushrooms. Promising species of mushrooms were selected for cultivation on aforementioned substrates. The composition of the

nutrient medium with breadcrumb for the cultivation of mycelium of medicinal mushrooms is protected by the patent of Ukraine on utility model (No. 98224).

Materials of dissertation work (the use of nutrient media on the basis of cereal processing wastes for cultivation of medicinal macromycetes) were introduced into the educational process at the Department of Industrial Biotechnology at the Faculty of Biotechnology and Biotechnics, Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute on discipline "Biotechnology of Agricultural Production", credit module № 3 "Designing and Production of Biotechnological Products" at carrying out of laboratory works on the topic "Processing of Agricultural Waste using Biotechnology".

**Keywords:** medicinal macromycetes, wastes of cereal processing, bioconversion efficiency, submerged cultivation, biomass, endopolysaccharides, amino acids, fatty acids, vitamins, antimicrobial activity.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Іванова Т. С., Круподьорова Т. А., Барштейн В. Ю., Мегалінська Г. П. Скринінг лікарських грибів при культивуванні на відходах харчової промисловості України // Науковий часопис НПУ імені М. П. Драгоманова. Серія 20. Біологія. – 2012. – №4. – С. 113–119. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, постановка експериментальної частини, участь у написанні статті)*
2. Іванова Т. С., Бісько Н. А., Круподьорова Т. А., Барштейн В. Ю. Особливості глибинного культивування *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. на хлібній крихті // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2012. – Т. 83, №3 (хімічні і біологічні науки і технології). – С. 30–35. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментальної частини, написання статті)*
3. Ivanova T. S., Bisko N. A., Krupodorova T. A., Barshteyn V. Yu. Breadcrumb as a new substrate for *Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune* submerged cultivation // Korean J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol.42, Iss.1. – P. 67–72. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, розроблена схема досліджень разом із науковим керівником, постановка експериментальної частини, написання статті)*
4. Ivanova T., Titova L., Megalinska G. Compositional study of *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. grown on the new substrate breadcrumb [Електронний ресурс] // Наукові доповіді НУБіП України. – 2015. – № 8 (57). Режим доступу: [http://nd.nubip.edu.ua/2015\\_8/16.pdf](http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/16.pdf) *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних даних; глибинне культивування та підготування зразків міцелію для дослідження амінокислотного, жирнокислотного та вітамінного складу; визначення вологості, зольності, вмісту сирого*

*протеїну, сирого жиру, вуглеводів та енергетичної цінності міцелію; написання статті)*

5. Іванова Т. С., Бісько Н. А., Мегалінська Г. П. Фізіологічна активність *Schizophyllum commune* та *Trametes versicolor* при культивуванні на сухарній крихті // Вісник ОНУ. Біологія. – 2015. – Т. 20, Вип. 2 (37). – С. 83–90. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних даних, розроблена схема досліджень та сформульовані висновки разом зі співавторами, постановка експериментальної частини, написання статті)*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

6. Іванова Т. С., Бісько Н. А., Барштейн В. Ю., Круподьорова Т. А. Біологічно активні речовини грибів відділу *Basidiomycota* (Огляд) // Проблеми харчування. – 2010. – №1–2(22). – С. 42–47. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, написання статті)*
7. Ivanova T. S., Krupodorova T. A., Barshteyn V. Yu., Artamonova A. B., Shlyakhovenko V. A. Anticancer substances of mushroom origin // Exp. Oncol. – 2014. – Vol.36. – Iss.1. – P. 1–9. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, написання статті)*
8. Іванова Т.С., Бісько Н.А., Циганков С.П., Новак А.Г. Поживне середовище для культивування грибів // Патент України на корисну модель № 98224. Заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Бюл. № 8 від 27.04.2015р., заявка u 2014 10934, МПК А01G 1/04 (2006. 01). *(Особистий внесок здобувача: ідея проведення дослідження, патентний пошук, розроблена схема досліджень разом із науковим керівником, постановка експериментальної частини, написання формули, реферату та опису до патенту)*

Тези конференцій:

9. Іванова Т., Мегалінська Г., Круподьорова Т. Гемаглютинуюча й антибактеріальна активність лектиновмісної витяжки *Ganoderma lucidum* // Молодь і поступ біології: збірн. тез VII Міжнар. наук. конф. студ. і аспір., 5- 8 квітня 2011 р. – Львів, 2011. – С. 50–51.
10. Бисько Н. А., Іванова Т. С., Барштейн В. Ю., Круподьорова Т. А., Антоненко Л. А., Мегалінська Г. П. Скринінг лікарських грибів для культивування на відходах харчової промисловості // Біотехнологія ХХІ століття: тези допов. V регіональної наук.-практ. конф. викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів, 26 квітня 2011 р. – Київ, 2011. – С. 59.
11. Іванова Т. С., Бисько Н. А., Барштейн В. Ю., Круподерова Т. А., Антоненко Л. А., Мегалинская А. П. Скрининг базидиомицетов – продуцентов ценных биологически активных веществ при культивировании на растительных отходах пищевой промышленности // Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения: тезисы докл. Научн.-практ. конф., 23-28 мая 2011 г. – Крым, Новый Свет, 2011. – С. 363.
12. Іванова Т. С., Круподьорова Т. А. Біохімічні особливості глибинного культивування лікарського бізидіоміцета *Ganoderma lucium* (CURTIS) P. KARST // Ukr. Biochem. J. – Київ. – 2011. – Т. 83. – № 4. – С. 141.
13. Іванова Т. С., Антоненко Л. А., Мегалінська А. П. Культивування лікарських грибів на субстраті з хлібної крихти в якості основи для створення функціональних продуктів // Біологія растений и біотехнологія : I конф. молод. учен.: сборн. тезисов, 5-7 октября 2011 г. – Белая Церковь, 2011. – С. 99.
14. Ivanova T. S., Megalinska G. P., Antonenko L. O. Amino acid composition of medicinal mushrooms grown on the waste of bread production // Biology: from



- a Molecule up to the Biosphere: Abstr. of the VIII International young scient. conf., 3-6 December 2013. – Kharkiv, 2013. – P. 159–160.
15. Ivanova T. S. Mushrooms as a component of functional foods // Plant Biology and Biotechnology: Abstr. Book of 2-nd Conf. of Young Scient., 23-24 December 2013.–Kyiv, 2013. – P. 76.
  16. Иванова Т. С., Титова Л. А., Мегалинская А. П. Утилизация продуктов переработки зернового сырья лекарственными грибами // Актуальные проблемы биоэкологии: Материалы Междунар. научн. конф., 23-25 октября 2014 г. – Минск, 2014. – С. 80–81.
  17. Ivanova T., Megalinska G., Titova L. Antimicrobial and cytostatic activity of mushrooms grown on the breadcrumb // Youth and Progress of Biology: XI International Scient. Conf. for Students and PhD Students, 20-23 April 2015: Book of abstr. – Lviv, 2015. – P. 342–343.
  18. Иванова Т. С., Тітова Л. О., Мегалінська Г. П. Сухарна крихта як субстрат для культивування лікарських грибів // Біотехнологія ХХІ століття: ІХ Всеукр. наук.-практ. конф., 24 квітня 2015 р.: тези допов. – К., 2015. – С. 43.
  19. Ivanova T. S., Bisko N. A., Titova L. O., Megalinska G. P. Vitamin content in medicinal mushrooms *Schizophyllum commune* and *Trametes versicolor* cultivated on breadcrumb // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: ІХ Междунар. научн. конф., 7-11 сентября 2015г.: тезисы докл. – Минск, 2015. – С. 154–155.
  20. Ivanova T., Bisko N., Titova L., Megalinska G. Submerged cultivation of medicinal mushroom mycelia on the breadcrumb // Molecular Microbiology and Biotechnology: Abstr. of International scientific conf. (Odessa, 21-23 June 2016). – Odessa, 2016. – P. 17.
  21. Ivanova T.S., Bisko N.A., Titova L.O., Tsugankov S.P. Utilization of bioethanol by-products in processis of Macromycetes cultivation // Current Problems of Biology and Ecology: Materials of International Scientific and

- Practical Conf. (Vinnytsia, 3-7 October 2016). – Vinnytsia, 2016. – P. 115–117.
22. Ivanova T., Megalinska G., Titova L. *Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune* mycelia in submerged cultivation on breadcrumb // Youth and Progress of Biology: XIII International Scientific Conf. for Students and PhD Students, 25-27 April 2017: Book of abstr. – Lviv, 2017. – P. 210–211.
23. Іванова Т. С., Бісько Н. А. Біологічно активні речовини лікарських макроміцетів при культивуванні на продуктах перероблення зернової сировини // Біологія рослин та біотехнологія: Третя конф. молодих учених, 16-18 травня 2017: збірка тез. – Київ, 2017. – С. 68.

## ЗМІСТ

|                                                                                                                                                                                   | Стор. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....                                                                                                                                                    | 22    |
| ВСТУП.....                                                                                                                                                                        | 23    |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....                                                                                                                                                  | 30    |
| РОЗДІЛ 1    БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ЛІКАРСЬКИХ<br>МАКРОМІЦЕТІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА<br>ВІДХОДАХ ТА ПРОМІЖНИХ ПРОДУКТАХ<br>ПЕРЕРОБНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ (огляд<br>літератури)..... | 32    |
| 1.1            Загальна характеристика біологічно активних речовин<br>лікарських макроміцетів.....                                                                                | 33    |
| 1.2            Культивування лікарських макроміцетів на відходах та<br>проміжних продуктах переробної промисловості .....                                                         | 40    |
| 1.3            Застосування лікарських макроміцетів для створення<br>біотехнологічних продуктів.....                                                                              | 44    |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                                                                                                                                                   | 53    |
| РОЗДІЛ 2    МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....                                                                                                                                   | 75    |
| 2.1            Види та штами макроміцетів .....                                                                                                                                   | 75    |
| 2.2            Культивування міцелію макроміцетів на продуктах<br>перероблення зернових культур.....                                                                              | 78    |
| 2.2.1          Культивування в стаціонарних умовах .....                                                                                                                          | 78    |
| 2.2.2          Глибинне культивування.....                                                                                                                                        | 81    |
| 2.3            Визначення фізико-хімічних показників біомаси<br>макроміцетів, культуральної рідини та субстратів .....                                                            | 82    |

|                                  |                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.4                              | Біотехнологічні параметри процесу культивування<br>макроміцетів на живильних середовищах із продуктами<br>перероблення зернових культур .....                                      | 85  |
| 2.5                              | Визначення гемаглютинувальної та антибактеріальної<br>активності міцелію макроміцетів.....                                                                                         | 86  |
| 2.6                              | Статистична обробка експериментальних даних.....                                                                                                                                   | 88  |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ..... |                                                                                                                                                                                    | 89  |
|                                  |                                                                                                                                                                                    |     |
| РОЗДІЛ 3                         | СКРИНІНГ ВИДІВ ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ ДЛЯ<br>КУЛЬТИВУВАННЯ НА ВІДХОДАХ ПЕРЕРОБЛЕННЯ<br>ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР .....                                                                     | 94  |
| 3.1                              | Характеристика складу субстратів – відходів перероблення<br>зернових культур.....                                                                                                  | 94  |
| 3.2                              | Скринінг культур макроміцетів при поверхневому<br>культивуванні на відходах перероблення зернових культур                                                                          | 96  |
| 3.3                              | Підбір концентрації сухарної крихти у живильному<br>середовищі при глибинному культивуванні міцелію<br>відібраних видів лікарських грибів.....                                     | 106 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....  |                                                                                                                                                                                    | 109 |
|                                  |                                                                                                                                                                                    |     |
| РОЗДІЛ 4                         | ДИНАМІКА ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ<br>ВІДБРАНИХ ВИДІВ ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ<br>НА СУХАРНІЙ КРИХТІ .....                                                                           | 112 |
| 4.1                              | Динаміка накопичення біомаси та морфологія культур<br>відібраних видів лікарських макроміцетів при глибинному<br>культивуванні на живильному середовищі з сухарною<br>крихтою..... | 112 |

|                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2                                                                                                                                                                 | Динаміка глибинного культивування <i>Trametes versicolor</i> IBK 353 та <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 на середовищі з сухарною крихтою..... | 121 |
|                                                                                                                                                                     | СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....                                                                                                                    | 128 |
| РОЗДІЛ 5 БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ <i>SCHIZOPHYLLUM COMMUNE</i> IBK 1768 ТА <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> IBK 353 ПРИ ГЛИБИННОМУ КУЛЬТИВУВАННІ НА СУХАРНІЙ КРИХТІ ..... |                                                                                                                                                     |     |
|                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                     | 133 |
| 5.1                                                                                                                                                                 | Біохімічна характеристика міцеліальної маси <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 та <i>Trametes versicolor</i> IBK 353.....                        | 133 |
| 5.1.1                                                                                                                                                               | Вміст амінокислот .....                                                                                                                             | 137 |
| 5.1.2                                                                                                                                                               | Жирнокислотний профіль.....                                                                                                                         | 143 |
| 5.1.3                                                                                                                                                               | Вміст вітамінів.....                                                                                                                                | 147 |
| 5.2                                                                                                                                                                 | Антимікробна активність <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 та <i>Trametes versicolor</i> IBK 353 .....                                           | 150 |
| 5.3                                                                                                                                                                 | Гемаглютинувальна активність <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 та <i>Trametes versicolor</i> IBK 353.....                                       | 152 |
|                                                                                                                                                                     | СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                                                                                                                     | 156 |
| РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....                                                                                                        |                                                                                                                                                     |     |
|                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                     | 162 |
|                                                                                                                                                                     | СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                                                                                                                     | 172 |
|                                                                                                                                                                     | ВИСНОВКИ.....                                                                                                                                       | 174 |
|                                                                                                                                                                     | ДОДАТКИ.....                                                                                                                                        | 176 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

а.с.р. – абсолютно суха речовина

БАР – біологічно активні речовини

ГПД(А) – глюкозо-пептоно-дріжджове живильне середовище  
(агаризоване)

PSK – polysaccharide K, Krestin (полісахарид К, Крестин)

PSP – polysaccharide peptide (полісахарид-пептидний комплекс)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Макроміцети – це гриби з макроскопічними плодовими тілами, їх використовують як цінний харчовий продукт та як джерело одержання природних фармакологічних речовин з протипухлинними, імуномодельюючими, протизапальними, антимікробними, антидіабетичними та іншими лікувальними властивостями [1-4]. Макроміцети мають суттєве біотехнологічне значення як продуценти лікарських речовин, антибіотиків, ферментів та дієтичних добавок.

Сучасні біотехнології культивування макроміцетів базуються на фундаментальних знаннях про їх біологічні властивості та потребують глибокого вивчення факторів, що забезпечують одержання біомаси міцелію й продуктів метаболізму бажаної якості в необхідній кількості. Метод глибинного культивування міцелію макроміцетів дозволяє скоротити час вирощування біомаси та дає змогу контролювати її хімічний склад [5], що вкрай важливо для розроблення біотехнології отримання дієтичних добавок та новітніх харчових інгредієнтів.

Значна кількість публікацій присвячена дослідженням біохімічного складу плодових тіл грибів, проте особливості складу міцелію лікарських грибів в умовах глибинного культивування на нових живильних середовищах потребують детального вивчення. З міцелію макроміцетів уже виділено ряд біологічно активних речовин, таких як полісахарид-протеїнові комплекси з *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (комерційні препарати PSP та PSK), D- та MD-полісахаридні фракції з *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray [6], лектини з *G. frondosa* [7] та *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler [8], терпеноїди з *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. [9] та *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. [10].

Для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів живильного середовища становить близько 20-30 % від загальних витрат на виробництво [11]. У зв'язку з цим, одним із шляхів

зниження собівартості цільового продукту є використання для вирощування біомаси продуцентів дешевих субстратів, у тому числі, відходів переробної промисловості [11]. Зернові культури та продукти їх перероблення широко використовуються для культивування макроміцетів [12], тому що вони є доступними, дешевими субстратами і потребують утилізації. Це особливо актуально для України, яка має великий потенціал сільськогосподарських угідь, 54-59 % загальної посівної площі яких засіяно зерновими культурами [13].

Пошук перспективних живильних середовищ для культивування лікарських макроміцетів, вивчення закономірностей їх росту та біосинтетичної активності, розроблення біотехнологій отримання екологічно чистої біомаси грибів з використанням відходів перероблення зернових культур нашої країни дозволить отримати новітні унікальні дієтичні добавки та харчові інгредієнти з лікувально-профілактичними властивостями. Саме це визначає актуальність і перспективність напрямку проведених досліджень.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в лабораторії процесів екстракції рослинної сировини та біоконверсії відділу промислової та харчової біотехнології та в лабораторії біотехнології біопалив та інновацій в зеленій енергетиці відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» в межах тем: «Розроблення технології створення функціональних продуктів із харчовою добавкою на основі лікарських грибів» (2009-2011 рр., № ДР 0109U000473), «Вивчення противірусної та протипухлинної активності лікарських грибів з метою створення функціональних продуктів харчування» (2012-2014 рр., № ДР 0112U000435), «Розробити наукові основи ферментації рослинної сировини під вакуумом для отримання летких біопаливних компонентів» (2014-2018 рр., № ДР 0114U002171).



**Мета і завдання дослідження.** Мета – дослідження особливостей культивування лікарських макроміцетів на рідких живильних середовищах з відходами перероблення зернових культур для отримання біомаси з біологічно активними речовинами.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Провести скринінг лікарських макроміцетів за накопиченням біомаси для культивування на відходах перероблення зернових культур.
2. Обрати субстрат, що сприяє максимальному накопиченню біомаси лікарських макроміцетів. Підібрати оптимальні концентрації субстрату для культивування грибів з метою досягнення максимальної ефективності біоконверсії субстрату.
3. Визначити біотехнологічні параметри процесу глибинного культивування відібраних видів грибів на обраному субстраті: дослідити динаміку накопичення біомаси, сирого протеїну, ендopolісахаридів та рН живильного середовища, розрахувати ефективність біоконверсії субстрату.
4. Встановити вміст вітамінів, а також амінокислотний та жирнокислотний профілі біомаси відібраних видів макроміцетів при глибинному культивуванні на обраному субстраті. Розрахувати енергетичну цінність та показники харчової цінності білків отриманої біомаси грибів.
5. Визначити антимікробну та гемаглютинувальну активність міцелію обраних видів грибів.

*Об'єкт дослідження* – особливості культивування лікарських макроміцетів *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune* та *Pleurotus ostreatus* на живильних середовищах з відходами перероблення зернових культур.

*Предмет дослідження* – особливості накопичення біомаси та синтезу біологічно активних речовин лікарськими макроміцетами при культивуванні

на рідких живильних середовищах з відходами перероблення зернових культур.

**Методи дослідження:** культивування макроміцетів та мікроміцетів *in vitro*, мікробіологічні (визначення антимікробної активності); хімічні (гравіметрія, титриметрія), біохімічні (діаліз, екстрагування, гемаглютинування), фізико-хімічні (потенціометрія, фотометрія, люмінесцентна спектрометрія, хромато-мас-спектрометрія, іонообмінна хроматографія); статистичні (обчислення середнього арифметичного та довірчих інтервалів, достовірність результатів досліджень оцінювали згідно t-критерію Стюдента при 5 %-му рівні значущості).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вивчено закономірності впливу живильних середовищ з відходами перероблення зернових культур на утворення біомаси лікарськими макроміцетами. Рідкі живильні середовища для культивування міцелію макроміцетів, до складу яких входили: вода та один із таких субстратів, як сухарна крихта, аспіраційні відходи ячменю, відходи III-ої категорії млина, багаса сорго, барда кукурудзи, були застосовані вперше.

Досліджено особливості глибинного культивування *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900 на живильному середовищі з сухарною крихтою, підібрано оптимальні концентрації субстрату для максимальної ефективності біоконверсії. Розроблено спосіб приготування глибинно культивованого посівного матеріалу для уникнення лаг-фази.

Отримано біомасу високопродуктивних штамів *S. commune* IBK 1768 (24,0 г/дм<sup>3</sup>) та *T. versicolor* IBK 353 (15,8 г/дм<sup>3</sup>) при глибинному культивуванні на сухарній крихті, що містить тіамін, рибофлавін, ніацин, фолати та виявляє антимікробну активність відносно *Proteus vulgaris* ATCC 6896, яка наближається до антимікробної дії антибіотику ампіциліну. Проаналізовано харчову та енергетичну цінність, жирнокислотний та

амінокислотний профіль біомаси *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 в стаціонарній фазі росту культур при глибинному культивуванні на вперше застосованому живильному середовищі з сухарною крихтою. Вперше визначено вміст вітамінів групи В у міцелію *S. commune*.

**Практичне значення.** Одержані дані дозволяють запропонувати використання відходів перероблення зернових культур України як компоненти нових за складом живильних середовищ для культивування біомаси лікарських макроміцетів на підприємствах з культивування грибів різної потужності. Відібрано *O. sinensis* IBK 1928, *G. applanatum* IBK 1701, *G. frondosa* IBK 976, *L. edodes* IBK 502 та *P. ostreatus* IBK 551, що перспективні для культивування на аспіраційних відходах ячменю, а також *C. militaris* IBK 1862, *G. lucidum* IBK 1900, *F. velutipes* IBK 1878, *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 – на сухарній крихті.

При глибинному культивуванні *S. commune* IBK 1768 на живильному середовищі з сухарною крихтою за 4 доби було отримано максимальну біомасу 24 г/дм<sup>3</sup>, що містила 41,40 % незамінних амінокислот від суми амінокислот (індекс незамінних амінокислот 94,25 %, прогнозована біологічна цінність 91,03 %), а також 9,74 мг% сумарно тіаміну, рибофлавіну, ніацину та фолатів. Досліджена харчова та енергетична цінність міцелію *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353, отриманого при культивуванні на сухарній крихті, може бути використана для створення дієтичних добавок та новітніх харчових інгредієнтів.

Склад живильного середовища із сухарною крихтою для культивування міцелію лікарських грибів захищено патентом України на корисну модель № 98224 «Поживне середовище для культивування грибів».

Матеріали дисертаційної роботи (використання живильних середовищ на основі відходів перероблення зернових культур для культивування лікарських макроміцетів) впроваджено у навчальний процес на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім.

Ігоря Сікорського з дисципліни «Біотехнологія сільськогосподарських виробництв», кредитний модуль № 3 «Проектування та виробництво біотехнологічної продукції» при виконанні лабораторних робіт за темою «Переробка відходів сільського господарства з використанням біотехнології».

**Особистий внесок здобувача.** Робота є самостійним дослідженням здобувача, яким проаналізовано наукову літературу, виконано основний обсяг експериментальних досліджень, узагальнено результати, систематизовано і статистично оброблено дані експериментального матеріалу. Частка автора 80 %.

Розроблення загальної схеми роботи, обґрунтування актуальності, вибір штамів лікарських макроміцетів, планування досліджень, обговорення результатів та формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником дисертаційної роботи д-ром біол. наук Н. А. Бісько (Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України). Наукові праці, що опубліковані у співавторстві, відображають результати спільного опрацювання отриманих даних. Постановка експериментів з дослідження амінокислотного складу білку в зразках виконувалась спільно з М. П. М'ясниковою (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України), якісного і кількісного складу вітамінів у зразках – з С.П. Степаненко та Л.І. Чехівською (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України), жирнокислотного складу зразків – з канд. біол. наук А.М. Остапчук (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України), антимікробної та гемаглютинувальної активності грибів – за участі канд. біол. наук Г. П. Мегалінської (Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова).

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації представлені на V регіональній науково-практичній конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2011), Научно-практической конференции «Биологически

активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новый Свет, 2011), Конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 2011), Первой конференции молодых ученых (с международным участием) «Биология растений и биотехнология» (Белая Церковь, 2011), VIII Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2013), Другій конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 2013), Международной научной конференции «Актуальные проблемы биоэкологии» (Минск, 2014), XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2015), IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (Київ, 2015), IX Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2015), III-й Международной научно-практической Конференции «Химия, Био- и Нанотехнологии, Экология и Экономика в Пищевой и Косметической промышленности» (Харьков, 2015), Міжнародній науковій конференції «Молекулярна мікробіологія та біотехнологія» (Одеса, 2016), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, 2016), XIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017), Третій конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (Київ, 2017).

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 7 статей у фахових журналах, 15 тез доповідей, отримано 1 патент України на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 199 сторінках друкованого тексту та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 289 посилань. Дисертаційна робота містить 22 рисунки, 16 таблиць та 7 додатків.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Moradali M.-F. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) / M.-F. Moradali, H. Mostafavi, Sh. Ghods, Gh.-A. Hedjaroude // Int. Immunopharmacol. – 2007. – Vol. 7, Iss. 6. – P. 701-724.
2. Rathore H., Prasad Sh., Sharma S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review // PharmaNutrition. – 2017. – Vol. 5, Iss. 2, P. 35-46.
3. Muszyńska B. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review / B. Muszyńska, A. Grzywacz-Kisielevska, K. Kała, J. Gdula-Argasińska // Food Chem. – 2018. – Vol. 243. – P. 373-381.
4. Soković M. Mushrooms as Sources of Therapeutic Foods / M. Soković, J. Glamočlija, A. Ćirić [et al.] // Handbook of Food Bioengineering series. – 2018. – Vol. 8 (Therapeutic Foods). – P. 141-178.
5. Elisashvili V. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocess and Products (Review) / V. Elisashvili // Int. J. Med. Mushrooms. – 2012. – Vol. 14, Iss. 3. – P. 211–239.
6. Meng X., Liang H., Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities // Carbohydr. Res. – 2016. – Vol. 424. – P. 30–41.
7. Степанова Л. В. Выделение и характеристика лектина с поверхности мицелия *Grifola frondosa* (Fr.) S.F. Gray / Л.В. Степанова, В.Е. Никитина, А.С. Бойко // Микробиология. – 2007. – Т.76. – С.488–493.
8. Ветчинкина Е. П. Активность внутриклеточных лектинов *Lentinus edodes* на разных стадиях развития гриба / Е. П. Ветчинкина, В. Е. Никитина, О. М. Цивилев, Л. Б. Гарибова // Микология и фитопатология – 2008. – Т.44. – С.76–83.

9. Gu L., Zhong X., Lian D., Zheng Y., Wang H., Liu X. Triterpenoid biosynthesis and the transcriptional response elicited by nitric oxide in submerged fermenting *Ganoderma lucidum* // Process Biochem. – 2017. – Vol. 60. – P. 19–26.
10. Wang X.-M. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography / X.-M. Wang, M. Yang, Sh.-H. Guan [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2006. – Vol. 41. – P. 838–844.
11. Підгорський В. С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу : монографія / В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська, Т. П. Пирог; НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – К. : Наук. думка, 2010. – 328 с.
12. Barshteyn V., Krupodorova T. Utilization of agro-industrial waste by higher mushrooms: modern view and trends // J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. – 2016. – Vol. 5, Iss. 6. – P. 563–577.
13. Статистичний збірник України. Україна у цифрах 2015 / За ред. І. М. Жук. – К. : Державна служба статистики України, 2016. – 239 с.

## РОЗДІЛ 1

### **БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА ВІДХОДАХ ТА ПРОМІЖНИХ ПРОДУКТАХ ПЕРЕРОБНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ (огляд літератури)**

Гриби – одна з найбільших та найрізноманітніших груп живих організмів на Землі. Згідно з сучасними прогнозами, на Землі існує 2,2-3,8 млн. видів грибів, проте лише 120 тис. з них описано вченими [1]. Макроміцети, до яких відносять 12 тис. видів [2], є представниками відділів *Basidiomycota* та *Ascomycota*. Вони формують великі, добре помітні неозброєним оком плодові тіла. Лікувальні властивості встановлено для близько 700 видів макроміцетів: підвищення імунітету, гепатопротекторна, протипухлинна, антидіабетична, кардіологічна дія, зниження рівня холестерину, покращення функціонального стану певних органів та систем організму (зокрема, нервової, статевої), лікування й профілактика хронічних захворювань [2-4].

Пошук нових перспективних продуцентів у біотехнології спрямований на отримання лікарських засобів, дієтичних добавок, новітніх харчових інгредієнтів тощо, які мають лікувально-оздоровчу та харчову цінність. Дослідження макроміцетів базується на їх здатності синтезувати широкий спектр фармакологічних речовин, що містяться у плодових тілах, міцелії, а також виділяються в живильне середовище або субстрат [5]. Такі дослідження мають декілька етапів [5], основними з яких є створення колекцій чистих культур, вивчення культурально-морфологічних та біосинтетичних характеристик штамів, розроблення способів їх культивування та пошук перспективних живильних середовищ, отримання та характеристика біологічно активних речовин (БАР).



### 1.1. Загальна характеристика біологічно активних речовин лікарських макроміцетів

Терапевтична дія лікарських макроміцетів, що застосовуються в медицині, пов'язана з наявністю в них БАР, які при потрапленні в організм людини проявляють той чи інший фізіологічний ефект [4]. Лікувальні властивості грибів широко застосовуються у народній медицині Далекого Сходу (Китай, Японія, Корея), де понад 2000 років люди збирали, сушили та використовували плодові тіла *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Dendropolyporus umbellatus* (Pers.) Jülich, *Tremella fuciformis* Berk. тощо [6, 7].

БАР, виділені з макроміцетів, поділяють на: високомолекулярні полісахариди (включаючи полісахаропептиди та протеоглікани), білки та глікопротеїни, органічні кислоти, терпеноїди, поліфеноли, алкалоїди, лактони, стероли та вітаміни [8]. У залежності від дії, яку проявляють ті чи інші хімічні речовини на живий організм, БАР поділяють на 3 групи: дієві, супутні та баластні [9].

Насамперед привертають увагу полісахариди грибів. На відміну від  $\beta$ -глюканів клітинних стінок злаків (які містять  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) зв'язки в головному ланцюгу із  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) відгалудженнями [10]), біологічно активні полісахариди грибів переважно належать до глюканів із  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) зв'язками в головному ланцюгу та  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) відгалудженнями [11], мають триланцюгову будову вправо закрученої спіралі, причому наявність бічних ланцюгів є необхідною умовою для біологічної активності, а також високомолекулярні полісахариди – більш ефективні, ніж низькомолекулярні [12]. Полісахариди грибів не здатні безпосередньо руйнувати ракові клітини, але вони активують імунну відповідь хворої людини (схема дії  $\beta$ -глюканів макроміцетів зображена у дод. В), попереджують утворення пухлин та метастазування [13].

Значний протипухлинний ефект, доведений клінічно, показали п'ять полісахаридів, що виробляються на комерційній основі (Табл. 1.1). Клінічні дослідження I-III стадій, проведені в Японії, Китаї та США, показали протиракову активність цих препаратів та відсутність короткотривалої і довготривалої токсичності [12].

Таблиця 1.1

**Протипухлинні полісахариди та полісахарид-протеїнові комплекси  
грибів, що пройшли клінічні дослідження**

| Вид                          | Походження              | Назва продукту       | Хімічна структура                | Посилання |
|------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------------------|-----------|
| <i>Grifola frondosa</i>      | Плодові тіла та міцелій | D- та MD-фракції     | $\beta$ -D-глюкан                | [13]      |
| <i>Lentinula edodes</i>      | Плодові тіла            | Лентинан             | $\beta$ -D-глюкан                | [12]      |
| <i>Schizophyllum commune</i> | Культуральна рідина     | Шизофілан            | $\beta$ -D-глюкан                | [12]      |
| <i>Trametes versicolor</i>   | Міцеліальна маса        | PSP<br>PSK (Крестин) | Полісахарид-протеїнові комплекси | [12]      |

D-фракція, отримана з депротейнізованого екстракту гарячою водою міцелію та плодових тіл *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray (табл. 1.1), складається переважно з  $\beta$ -D-глюкану з 1→6 зв'язками в головному ланцюгу та 1→4 відгалуженнями, а також із 1→3 зв'язками в головному ланцюгу та 1→6 відгалуженнями [12]. За механізмом дії D-фракція *G. frondosa* – активатор макрофагів, що підвищує утворення цитокінів. Дослідження *in vitro* показали, що ця фракція інактивує гліоксилазу I, фермент, який метаболізує протипухлинні ліки, таким чином підвищується їх біодоступність [12]. MD-фракція *G. frondosa* отримана шляхом подальшого очищення D-фракції. Ця фракція призводить до апоптозу ракових клітин шляхом активації гену ВАК-1 [13]. Комбінування інтерферону  $\alpha 2b$  та MD-фракції *G. frondosa* виявляє

синергійний ефект, що викликає активацію ДНК-залежної протеїнкінази та призводить до зупинки клітинного циклу в інтерфазі G1 [13].

Лентинан – водорозчинний протипухлинний полісахарид, що був виділений у 1969 році Goro Chihara та іншими [14] із плодових тіл *L. edodes* (табл. 1.1). Лентинан має молекулярну масу 500 кДа, головний ланцюг складається із глюкози, поєднаної  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) зв'язками та бічних ланцюгів, пов'язаних  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) зв'язками із головним (дод. Г, І). Лентинан приєднується до поверхні лімфоцитів або специфічних білків сироватки крові, що активує макрофаги, Т-кілери та інші ефекторні клітини, внаслідок чого підвищується утворення антитіл, інтерлейкінів 1, 2 та інтерферону  $\gamma$  [15].

Будова та протиракова активність іншого полісахариду шизофілану, отриманого з культуральної рідини *Schizophyllum commune* Fr. подібна до такої у лентинану [12]. Шизофілан – це  $\beta$ -глюкан із 1 $\rightarrow$ 3 зв'язками, до кожного третього чи четвертого залишку основного ланцюга якого приєднана за допомогою 1 $\rightarrow$ 6 зв'язків  $\beta$ -глюкопіранозильна група (дод. Г, ІІ). Шизофілан відновлює та посилює клітинний імунітет шляхом активації макрофагів та підвищення кількості Т-кіллерів, а також викликає експресію генів цитокінів [16].

Із міцеліальної маси базидіального гриба *Trametes versicolor* (L.) Lloyd отримані різні полісахаридні фракції. PSK (комерційна назва Крестин) –  $\beta$ -D-глюкан-протеїновий комплекс, отриманий японською фірмою «Kureha Kagaku Koguo K.K.» методом екстракції гарячою водою [17]. Дослідниками Шанхайського університету (Китай) із міцеліальної маси *T. versicolor* Cov-1 був виділений полісахарид-пептидний комплекс PSP [17], до складу якого входить 90 % полісахариду та 10 % білка, молекулярна маса – близько 100 кДа. Хімічний склад PSP схожий до Крестину, проте перший не містить фукози, а останній – арабінози та рамнози [18]. PSP отримали шляхом осадження етанолом із міцелію, культивованого протягом 36-72 годин, на відміну від PSK (10-ти добова культура) [18].

Механізм протипухлинної дії PSP та PSK включає: протидію пригніченню імунітету раковими клітинами; активацію протиракової імунної відповіді – дозрівання дендритних клітин, макрофагів, корекція балансу Th1/Th2 та стимуляція утворення інтерлейкінів моноцитами; посилення ефекту хемотерапії та радіотерапії індукцією апоптозу та пригніченням метастазування [18, 19].

Полісахариди та полісахарид-протеїнові комплекси макроміцетів виявляють не тільки протипухлинні та імуномодельовальні властивості. Зокрема, показано, що полісахаридна фракція *L. edodes* характеризується гепатопротекторною дією, а також здатністю підвищувати продукцію антитіл до гепатиту В. Ці властивості лентинану дозволяють використовувати його для лікування хронічних гепатитів та гепатиту В у людини [4].

Досліди на мишах показали, що гандодерани А і В – глюкани плодових тіл *G. lucidum*, значно знижують рівень цукру в крові при захворюванні діабетом. Встановлено, що корелан (β-глюкопротеїд), виділений із міцеліальної біомаси *T. versicolor*, показав на тваринах та *in vitro* активність проти експериментального діабету [4].

Особливу увагу привертають білкові речовини грибів – лектини та ферменти. Лектини – це білки неімуноглобулінової природи, здатні до специфічного впізнавання та зворотного зв'язування з вуглеводною частиною глікокон'югатів без порушення ковалентної структури будь-яких впізнаних глікозидних лігандів [20]. Лектини приймають участь у мобілізації і транспорті цукрів, організації клітини, регуляції росту та диференціації, в процесі проникнення паразитів у організм хазяїна і при утворенні симбіотичних взаємовідносин (наприклад, при формуванні мікоризи та бактеріоризи) [20]. Лектини також широко використовують як біохімічні інструменти в багатьох напрямках дослідження: в якості специфічних аглютинінів при визначенні групових антигенів крові, у синтезі афінних сорбентів, що використовуються для фракціонування чи аналізу

полісахаридів, гліколіпідів та глікопротеїнів, при цито- та гістохімічних дослідженнях глікокон'югатів тканин та клітинних поверхонь [21].

Лектини широко розповсюджені у тварин, рослин, бактерій, вірусів та грибів. Проте серед макроміцетів лектини більш розповсюджені, ніж серед вищих рослин. У родах *Lactarius*, *Russula*, *Boletus*, *Phallus* та в родині *Hygrophoraceae* відмічено великий відсоток видів із лектиноюю активністю. Окремі види мають декілька лектинів, інколи дуже схожої специфічності, інколи зовсім відмінні. Лектини було знайдено у міцелії *Kuehneromyces mutabilis* (Schaeff.) Singer & A.H. Sm., *Pholiota squamosa* (Vahl) P. Kumm., *G. lucidum*, *L. edodes* та *G. frondosa* [20, 22].

Крім гемаглютинувальної активності, до специфічних властивостей лектинів належить мітогенна, або ріст стимулююча активність стосовно певних видів клітин, зокрема імунокомпетентних [23]. Із плодових тіл *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer було виділено два лектини, один із яких виявляв мітогенну активність на макрофаги миші, а інший пришвидшував транскрипційну експресію інтерлейкіну 2 та інтерферону  $\gamma$  [24].

Лектини можуть виявляти пряму цитотоксичну дію на клітини пухлин. Лектини, виділені з *Polyporus adusta* (Willd.) Fr. та *Ganoderma capense* (Lloyd) Teng пришвидшували ріст макрофагів і сповільнювали ріст клітин пухлини [24]. Із плодових тіл *G. frondosa* виділено лектин, що мав цитотоксичний вплив на лінії клітин HeLa [25]. Антипроліферативна дія деяких лектинів на лінії ракових клітин людини Hep G2 та MCF-7 вивчалась у ряді досліджень [25-34]. Слід зазначити, що лектини завдяки своїй унікальній здатності специфічно зв'язуватись із глікокон'югатами використовуються не лише безпосередньо для пригнічення росту ракових клітин, а і для діагностики та створення проліків, що активуються при контакті з клітинами пухлин.

Базидієві гриби мають велике значення як деструктори, що перетворюють біополімери лігнін та полісахариди у легкодоступну форму. Виробництво ферментних препаратів є одним із провідних напрямків у

розвитку біотехнології у всьому світі. Використання лігно- та целюлозоруйнуючих ферментів базидіомікот перспективне, зокрема, у паперовій промисловості, при отриманні кормів для худоби та для деструкції різноманітних відходів виробництва, що забруднюють навколишнє середовище [35].

Протеїнази, виділені із базидіальних грибів, широко використовуються у промисловості. Так, сичужна дія ферментів *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. була використана у виробництві сиру Чеддер, протеїнази *Russula decolorans* (Fr.) Fr. застосовуються для заміни ренніну при згортанні молока [35]. Протеїнази *Armillariella mellea* (Vahl) P. Kumm. використовуються у вигляді тромболітичного засобу, а з *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quél. та *F. velutipes* одержують фібринолітичний засіб [35].

У складі ліпідів грибів переважають поліненасичені та мононенасичені жирні кислоти (олеїнова, лінолева), які позитивно впливають на стан здоров'я людини: їх наявність у дієті сприяє зниженню рівня холестерину в крові, регуляції кров'яного тиску та покращенню кровообігу [36].

Встановлено [37, 38], що до складу шапинкових грибів входить широкий спектр вітамінів: провітамін А (каротини), вітаміни групи В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>13</sub>), вітаміни С, D (кальцифероли) та провітамін D (ергостерол). Вміст вітаміну С у базидіомікот у порівнянні з рослинними продуктами (зелений лук, смородина, лимони тощо) досить незначний. У той же час, усі досліджені роди грибів, крім *Leccinum* та *Paxillus*, продукують вітамін В<sub>1</sub> у концентрації, що характерна для більшості зернових культур [38]. Вміст вітаміну В<sub>2</sub> у плодових тілах багатьох видів їстівних грибів значно вище, ніж в овочах та злаках. Серед досліджених видів плодового тіла *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. містять найбільшу кількість вітаміну В<sub>3</sub> [38].

Базидієві гриби багаті на такі важливі сполуки, як терпеноїди різних класів (монотерпеноїди, сесквітерпеноїди, дитерпеноїди, сестертерпеноїди, тритерпеноїди, тетратерпеноїди). До терпеноїдів належать терпени –

низькомолекулярні біорегулятори, що складаються з ізопренових одиниць, та їх похідні. Зокрема, із плодових тіл, спор та міцелію *G. lucidum* і *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. виділено близько 130 різних тритерпеноїдів [39]: зокрема, ганодерові кислоти (дод. Д), ганодерал А і В, епоксипанодеріол А, В, С, люцидон А, В, С тощо. Деякі з них мають антиандрогенну, антиоксидантну, протипухлинну, антикомплементарну, протимікробну дію, активність проти гепатиту В, ВІЛ-1, селективно пригнічують еукаріотичну ДНК-полімеразу та фермент, що перетворює ангіотензін [40].

Дослідження показали, що феноли, флавоноїди та вітаміни базидіальних грибів проявляють антиоксидантні властивості [41], тобто нейтралізують вільні радикали. Продемонстрована здатність амінокислоти грибів ерготіонеїну попереджувати опосередковану вільними радикалами індуковану міддю клітинну токсичність [42]. Описані антиоксидантні властивості екстракту *Geastrum saccatum* Fr., багатого на  $\beta$ -глюкан, та ліпідної фракції *G. frondosa* [41].

Клітинна оболонка грибів містить до 60 % сухої маси хітину [4]. Схематичне зображення клітинної стінки макроміцетів та розташування хітину в ній показано у дод. Ж. Хімічна природа хітину – лінійний полімер, в молекулу якого входять  $\beta$ -1,4-зв'язані одиниці N-ацетилглюкозаміну. В оболонках грибних клітин вони зібрані у кристаліти [38].

Хітин та його дезацетильоване похідне хітозан, що промислово отримують із хітину, проявляють антиоксидантну, антимікробну, протизапальну, протипухлинну та антидіабетичну дію, знижують тиск та рівень холестерину в крові [43]. Хітин та хітозан використовують у різноманітних біотехнологічних процесах: як катіонні агенти при очищенні забруднених водойм; в якості дієтичної добавки для людини та тварин; для загоєння ран та опіків; як антикоагулянт, протитромбічний та гемостатичний засіб; для тимчасової заміни шкірної та кісткової тканини, як компонент у

штучних кровоносних судинах та клапанах, імплантат у косметичній хірургії; як косметичний інгредієнт; у текстильній, паперовій промисловості, при виробництві кіноплівки та губок; як імобілізаційний шар у хроматографії; як аналітичний реагент [44].

В клітинній оболонці грибів зустрічаються також пігменти, зокрема, меланіни. Меланіни характеризуються антиоксидантними, генопротекторними, радіопротекторними, імуномодельовальними та гепатопротекторними властивостями. В процесі травлення меланін частково засвоюється при участі мікрофлори кишечника, частково виконує роль ентеросорбенту, регулятору перистальтики, нормалізує склад кишкової мікрофлори [45].

Сукупність високомолекулярних компонентів плодових тіл та міцелію макроміцетів – полісахариди, протеоглюкани та хітин в літературі називають харчовими волокнами [4]. Ці речовини поліпшують роботу шлунку та кишечника, сорбують і виводять з організму шлаки, іони важких металів, канцерогени та радіонукліди [4, 46].

## **1.2. Культивування лікарських макроміцетів на відходах та проміжних продуктах переробної промисловості**

Виявлені лікувальні та харчові властивості макроміцетів обумовлюють виробництво дієтичних добавок, новітніх харчових інгредієнтів, профілактично-лікувальних та косметичних препаратів на основі їх плодових тіл, міцелію та культуральної рідини [47]. Для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів живильного середовища становить близько 20-30 % загальних витрат на виробництво [48], тому одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання як ростових субстратів дешевої промислової сировини, а також відходів переробної промисловості. В додатку 3 наведено перелік живильних



середовищ та субстратів на основі відходів та проміжних продуктів переробної промисловості для культивування міцелію макроміцетів.

Серед рідких живильних середовищ для культивування міцелію грибів досить часто використовують молочну та підсирну сироватку [49-57], пивне сусло [58, 59] та бурякову і тростинну мелясу [59-61]. Такі компоненти середовища мають високі поживні властивості, містять легкодоступні вуглеводи, багаті на мікроелементи та вітаміни. З одного боку, це сприяє накопиченню біомаси міцелію грибів. З іншого боку, це зумовлює їх використання при виробництві харчових продуктів та напоїв. Зокрема, пивне сусло – це не відхід, а сировина для виробництва пива.

Молочну та підсирну сироватку використовують для виробництва дієтичних, функціональних та алкогольних напоїв [80], для виробництва сирів [81], додають у хлібо-булочні вироби [82], крім цього, розроблені технології ферментування сироватки дріжджами та бактеріями з утворенням етанолу, метану, гідрогену, молочної кислоти й електроенергії [83]. Бурякову та тростинну мелясу використовують як підсолоджувачі при виробництві харчових продуктів, як кормову добавку, при виробництві спирту, для культивування дріжджів [84, 85], а також розроблені технології отримання цільових продуктів шляхом ферментування мікроорганізмами: біодизелю, гідрогену, метану [86], целюлози [87] та молочної кислоти [88].

Інші природні компоненти, що використовуються для живильних середовищ при культивуванні макроміцетів, зазвичай є твердими відходами переробної промисловості. Тому для приготування живильних середовищ їх подрібнюють та додають водопровідну чи дистильовану воду. Метою використання таких відходів є як безпосередньо утилізування відходів, так і утворення біомаси грибів та їх метаболітів.

При виборі нових субстратів для культивування макроміцетів дослідники, як правило, користуються такими критеріями [65, 67, 71]:

- дешевизна та легкодоступність (наприклад, відходи промисловості);

- містить органічні речовини (оскільки гриби – гетеротрофні організми), які, з одного боку, здатні забезпечити потреби макроміцетів у поживних речовинах;
- для глибинного культивування міцелію обирають рідкі живильні середовища або такі, які можливо подрібнити та перемішати з водою;
- для подальшого використання міцелію з метою створення харчових добавок, новітніх харчових інгредієнтів тощо для вживання людиною субстрат для культивування має відповідати вимогам харчової безпеки (зокрема, не містити отрути, не перевищувати вміст радіоактивних речовин та ін.);
- субстрат має забезпечувати високий вихід цільового продукту – біомаси та/або біологічно активних речовин – незамінних амінокислот, полісахаридів, ферментів, лектинів тощо.

Україна має великий потенціал сільськогосподарських угідь, 54-59 % загальної посівної площі яких засіяно зерновими культурами згідно до даних Державної служби статистики України за 2009-2015 роки [89]. За виробничим принципом польові культури рослин поділяють [90] на зернові, технічні, кормові, баштанні, лікарські. Так, у групу зернових входять культури із родин *Gramíneae* (Злакові), *Fabáceae* (Бобові) та *Polygonáceae* (Гречкові) [90]. До основних зернових культур України належать пшениця, ячмінь, кукурудза, жито, овес, зернобобові, гречка, просо та рис [89].

Так як для культивування плодових тіл макроміцетів успішно використовують зернові культури та продукти їх перероблення [91], а також через відсутність даних літератури щодо використання цих субстратів для культивування міцелію макроміцетів нас зацікавили такі продукти перероблення зернових культур як післяспиртова барда кукурудзи, багаса сорго, відходи з млина для пшениці та жита III-ої категорії, аспіраційні відходи ячменю та сухарна крихта.

Встановлено, що умови для накопичення максимальної кількості біомаси не завжди співпадають з умовами для підвищеного синтезу біологічно активних речовин [92-96]. Показано [96], що міцелій *F. velutipes* при відсутності джерела Фосфору в живильному середовищі синтезує бетаїнові ліпіди (діацилгліцерилтриметилгомосерини), які не було виявлено у плодових тілах та міцелії за наявності джерела Фосфору в живильному середовищі.

Для отримання ферментів при культивуванні макроміцетів особливу увагу слід приділяти температурі культивування, рН живильного середовища та наявності дієвих індукторів [92, 97, 98]. Так, для отримання пептидази при глибинному культивуванні модельного лігнолітичного організму *Phanerochaete chrysosporium* Burds. [99] до живильного середовища додавали подрібнене перо (2 %). Показано також, що кінетика накопичення лаккази у базидіальних грибів залежить від джерела Нітрогену в живильному середовищі [67]. Крім того, підвищення вмісту Нітрогену у середовищі сприяє підвищенню вмісту білка в міцелії грибів [100].

Експресія ендоглюканази та ксиланази у *Pleurotus dryinus* (Pers.) P. Kumm. та *Pseudotrametes gibbosa* (Pers.) Bondartsev & Singer ex Singer індукувалася додаванням целюлозного препарату Авіцель, глюкоза та гліцерол у живильному середовищі навпаки спричинювали катаболітну репресію цих ферментів (їх синтез починався тільки після розкладання глюкози та гліцеролу) [101]. Навпаки, для синтезу водорозчинних екзополісахаридів глюкоза може мати стимулювальну дію, що показано на прикладах [102] культивування *A. cylindracea*, *T. versicolor*, *G. applanatum*, *Lyophyllum decastes* (Fr.) Singer та *G. frondosa*.

Природні субстрати містять суміш ростових джерел Карбону, тому слід зазначити: кінетика біодеградації (як і крива накопичення біомаси) може описуватися різними моделями, відмінними від класичної моделі Моно, яка

базується на припущенні, що утилізується тільки один лімітувальний субстрат [103].

Так, може мати місце моделі конкурентного інгібування (коли дві чи більше сполук використовуються як субстрати, а сполуки утилізуються конкурентно, але одночасно), неконкурентного інгібування (два чи більше субстрата одночасно приєднуються до фермента, утворюючи неактивний комплекс), безконкурентного інгібування (інгібувальний субстрат приєднується до комплексу ферменту з субстратом, а не до вільного ферменту), модель суми кінетики з параметрами взаємодії (включає ступінь, за яким один субстрат впливає на біодеградацію іншого) [103].

Процес утилізації субстратів залежить від концентрації, способу культивування, природи джерел Карбону тощо [48]. Наприклад, за високих концентрацій субстрату може спостерігатися послідовне їх використання (диауксія), а за ріст-лімітувальних (низьких) концентрацій має місце їх одночасна утилізація (міксотрофія); за безперервного культивування на суміші субстратів спостерігається одночасна утилізація, а за періодичного – послідовна [48].

Як альтернатива послідовному використанню різних джерел Карбону, катаболітна репресія може спостерігатися у випадку дисбалансу між катаболізмом та анаболізмом, а саме, коли швидкість катаболізму перевищує швидкість анаболізму [104].

### **1.3. Застосування лікарських макроміцетів для створення біотехнологічних продуктів**

Харчові продукти поділяються на продукти масового вжитку, лікувальні (дієтичні) та лікувально-профілактичні, а також продукти дитячого харчування [105]. Міцелій лікарських макроміцетів може бути використаний для створення дієтичних та лікувально-профілактичних

продуктів харчування, при цьому необхідно досліджувати та враховувати харчову цінність отриманого міцелію.

Концепція харчування поступово змінюється від проблем виживання, втамування голоду та відсутності побічних ефектів на здоров'я у бік вживання їжі для покращення здоров'я, самопочуття та зменшення ризиків хронічних захворювань [106]. В такому ракурсі підвищений інтерес споживачів та науковців викликають функціональні продукти харчування, тобто продукти, які містять харчовий компонент, що покращує одну або більше направлених функцій в організмі або завдяки якому потенційно небезпечний компонент вилучається технічними засобами [106].

Ряд функціональних продуктів харчування був розроблений із залученням як новітнього харчового інгредієнту лікарських макроміцетів. Зокрема, міцелій *Antrodia camphorate* (M. Zang & C.H. Su) Sheng H. Wu, Ryvardeen & T.T. Chang, *Agaricus blazei* Murrill, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. та *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng [107], а також плодові тіла *L. edodes* [108], *P. ostreatus* [109] та *T. fuciformis* [110] були використані для заміщення (1-10) % пшеничного борошна для збагачення амінокислотного складу та вмісту харчових волокон у пшеничному хлібі. Заміна 3 % маси дріжджів порошком плодових тіл *P. ostreatus* при виробництві хлібобулочних виробів покращувала показники хліба за рахунок інтенсифікації дріжджової активності, в результаті чого збільшувалася піднімаюча сила та зменшився час бродіння [109]. Фракція  $\beta$ -глюканів плодових тіл *L. edodes* використовувалась для заміщення (1-3) % пшеничного борошна для приготування печива [10], а також для заміщення (4-12) % рисового борошна для приготування рисової локшини [111].

Плодові тіла *B. edulis* та *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray [112], а також міцелій та культуральна рідина *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (отримані при культивуванні на шроті амаранту) [113] були застосовані як новітні харчові інгредієнти для

створення харчового концентрату функціонального призначення – грибного супу.

Екстракти плодових тіл *Suillus luteus* (L.) Roussel та *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo використовувались для мікроінкапсулювання (в оболонці з мальтодекстрину) в сир [114]. Досліджувалось також внесення (2,5-15) % екстрактів плодових тіл та 5 % подрібнених плодових тіл *B. edulis* для створення функціонального кисломолочного продукту (сиру) [115].

Для створення Вустерширського соусу з покращеним смаком та антиоксидантними властивостями в рецептуру додавали міцелій базидіальних грибів з целюлазною активністю, таких як *T. versicolor*, *G. frondosa*, *P. ostreatus* та *Panellus serotinus* (Pers.) Kühner для ферментування складових соусу [116]. Для отримання оцту з біологічно активними речовинами використовували залишки субстрату після культивування плодових тіл *Cordyceps militaris* (L.) Link [117].

Досліджували також включення міцелію *P. ostreatus* (отриманого при культивуванні на шротах проростків пшениці, гарбуза, розтопші, льону, вівсу, шипшини та волоського горіху) до складу сосисок та ковбас [118]. При цьому, комп'ютерне моделювання показало, що в рецептурі сосисок можлива заміна 10-30 % м'яса яловичини чи свинини на міцелій *P. ostreatus*.

Макроміцети також були залучені до створення функціональних напоїв, таких як вино [119-121], пиво, sake [121], сьотю (японський міцний спиртний напій) [122], збагачене Кальцієм соєве молоко [123].

Слід зазначити, що для створення функціональних продуктів харчування, крім лікувальних властивостей, важливе значення мають органолептичні показники макроміцетів. Зокрема, основними сполуками, що формують аромат сирих грибів, є аліфатичні спирти та кетони з 8-ма атомами Карбону: 1-октен-3-ол, 2-октен-1-ол, 3-октанол, 1-октен-3-он та 3-октанон [124]. Аромат термічно оброблених грибів утворюють леткі сполуки

(основними з яких є метіональ, ненасичені спирти та кетони), що утворюються в результаті ферментативного та окислювального розкладу поліненасичених жирних кислот, а також в ході серії каскадних реакцій між амінокислотами та цукрами (реакція Майара) [124]. Смак грибів в основному спричиняють невеликі за масою водорозчинні органічні сполуки, такі як 5'-нуклеотиди, вільні амінокислоти та розчинні вуглеводи [125].

Динамічні спостереження за станом харчування в Україні свідчать [126], що понад 50 % населення харчується неякісно. При цьому, близько 35 % людей споживає недостатньо білків, близько 30 % – надлишок жирів, а вміст вітамінів групи В у раціонах характеризується дефіцитом у 18,4-32,5 % [126]. Аналіз харчування більшості працездатного населення виявив [126] низьке споживання продуктів з високою біологічною цінністю на фоні надмірного споживання продуктів з незначною біологічною цінністю та високою енергетичною цінністю. Збагатити раціон харчування есенціальними нутрієнтами (незамінними амінокислотами, ненасиченими жирними кислотами, вітамінами, мікроелементами) можуть допомогти функціональні продукти харчування та/або дієтичні добавки, компонентами яких є міцелії лікарських грибів, отриманий при культивуванні на дешевих та екологічно чистих субстратах.

Популярною формою використання макроміцетів є створення на їх основі дієтичних добавок чи їх інгредієнтів. Дієтична добавка – це харчовий продукт, що споживається у невеликих визначених кількостях додатково до звичайного харчового раціону, який є концентрованим джерелом поживних речовин, у тому числі білків, жирів, вуглеводів, вітамінів (цей перелік не є виключним), і виготовлений у вигляді таблеток, капсул, драже, порошків, рідин або в інших формах [127].

Найбільшим виробником таких добавок є США, зокрема, такі компанії як Nature's Sunshine Products, Ming Gold, SC Formula, Mico Forte, Rare Red Reishi [4], NAMMEX (North American Medicinal Mushroom Extracts), Fungi

Perfecti LLC, Diamond Organics, а також Medicines Group Co. Ltd (Китай), Mycology Research Laboratory Ltd. (Великобританія), Concord (Австралія) [46].

В Інституті ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України створена технологія глибинного культивування їстівного гриба *P. ostreatus* для отримання дієтичної добавки з антиоксидантними, інтерфероногенними, антисклеротичними та радіопротекторними властивостями [46]. Розроблено препарат «Мікотон» з використанням плодових тіл *Fomes fomentarius* (L.) Fr., що показав клінічну ефективність при лікуванні хронічних захворювань шлунково-кишкового тракту [46]. У Біларусі виробляють торгові продукти «Лентин» та «Діалентин» на основі *L. edodes*.

Найпопулярнішими у світі видами вищих базидієвих грибів, на основі яких розробляються дієтичні добавки та функціональні продукти харчування, є *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *H. erinaceus*, *T. versicolor*, *T. fuciformis* [17].

Окрім перерахованих у розділі шляхів біотехнологічного використання лікарських макроміцетів та їх біологічно активних речовин слід зазначити новітні підходи, які розвиваються в Україні та у світі в XXI столітті: створення протиракових вакцин, наночастинок благородних металів, напівпровідникових нанокристалів, косметичних засобів, а також очищення стічних вод за участю макроміцетів.

Відкриття властивості імунної системи розпізнавати молекулярні мішені на поверхні пухлинних клітин спрямувало дослідження в напрямку розроблення протиракових вакцин, які покращують розпізнавання та елімінування цих клітин [128, 129]. Протиракові вакцини – це препарати біологічної природи, які мають у своєму складі антиген ракових клітин для стимулювання специфічного протиракового імунітету [130]. Антиген може потрапляти в організм різними шляхами: як вакцина у формі рекомбінантних ракових клітин, вакцина з дендритними клітинами (в якій дендритні клітини



зв'язані з антигеном), ДНК-вакцина (яка трансформує клітини людини чи тварин рекомбінантною ДНК вірусів, бактерій чи дріжджів) або як пептидна вакцина, що зв'язується з рецепторами Т-клітин та стимулює клітинний імунітет [130].

В Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України розроблено протипухлинні вакцини на основі глікопептидів аутологічних злоякісних клітин лімфолейкозу L1210, карциноми легені Льюїс, меланоми В16, саркоми 37 та карциноми Ерліха [131]. Оскільки антигени пухлинних клітин мають низьку імуногенність [129], у дослідженні [131] пропонується використовувати імуотропний ад'ювант полісахаридної фракції плодових тіл *L. edodes*.

Показано [132], що збагачена фукозою полісахаридна фракція *G. lucidum* індукує утворення антитіл до асоційованих з пухлинами епітопів типу Globo H. Розроблено також ад'ювант на основі імуномодельовального білку Ling Zhi-8 із міцелію *G. lucidum*, що значно підвищував ефективність протиракової ДНК вакцини; рекомбінантний білок Ling Zhi-8 ампліфікували в клітинах дріжджів [133].

У спільному проекті Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» з Національним Київським університетом ім. Т. Г. Шевченка був розроблений метод «зеленого» синтезу флуоресцентних напівпровідникових нанокристалів (квантових точок) CdS при культивуванні базидієвого гриба *P. ostreatus* (штам IBK 551) в присутності солей CdSO<sub>4</sub> та Na<sub>2</sub>S [134, 135]. Отримані квантові точки мають розміри від 2 нм до 9 нм, широкий спектр поглинання, що залежить від діаметру наночастинки, а також основний пік люмінесценції при 462 нм [135]. Нанокристали сульфід кадмію викликають значний інтерес з огляду на можливість їхнього використання у біології та біомедицині як флуоресцентних міток для детектування субклітинних структур та окремих молекул речовин [134].

За допомогою водного екстракту плодових тіл цього ж гриба *P. ostreatus* із  $\text{AgNO}_3$  були синтезовані наночастинки срібла розміром до 40 нм, що проявляли антибактеріальну активність [136]. Екстракт базидієвого гриба *Pleurotus florida* використовували для утворення наночастинок золота, що мали цитотоксичний ефект до ракових ліній клітин [137], а глюкан *P. florida* – для утворення наночастинок срібла із антибактеріальною активністю [138].

Окрім макроміцетів роду *Pleurotus* для отримання наночастинок використовували базидієві гриби роду *Schizophyllum* [139, 140]. Показано, в що глибинно вирощеному міцелію, в культуральній рідині при культивуванні міцелію та в безклітинній системі культуральної рідини *S. commune* сполука  $\text{AgNO}_3$  редукується з утворення наночастинок срібла розміром (25-53) нм, які мають більш виражені антимікробні властивості, ніж вихідна сполука [139]. При культивуванні *Schizophyllum radiatum* Fr. із  $\text{AgNO}_3$  було отримано наночастинки срібла розміром 10-40 нм, які також мали посилені антимікробні властивості [140].

Виявлення антитирозиназної, антигіалуронудазної, антиколагеназної та антиеластазної активності лікарських макроміцетів наряду з більш детально дослідженими антиоксидантними, антимікробними та протизапальними властивостями призвело до використання екстрактів та БАР макроміцетів при виробництві косметичних засобів [141]. Зокрема, антитирозиназну активність показали екстракти *T. versicolor* [142], *G. lucidum* [143], *P. ostreatus* [144] та *L. edodes* [145], а також органічні кислоти (*p*-кумарова кислота [146] та її похідні [147], ферулова та кавова кислоти [148, 149], галова кислота [150, 151]), N-нікотиноїл тирамін [152] та гісполон [153], виділені з макроміцетів. Антиколагеназна активність була зафіксована для екзополісахаридів [154] та екстракту міцелію [155] *G. frondosa*, а також для *p*-кумарової кислоти [156] та її похідних [147], елагової кислоти [157] і для ерготионеїну [158], виділених з макроміцетів. Бренд Сполучених Штатів

Америки Dr. Andrew Weil For Origins™ Mega-Mushroom розробив заспокійливу маску, що захищає шкіру від ознак старіння і містить екстракти *G. lucidum* та *O. sinensis*, а також міцелій *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead [141]. Міжнародні косметичні компанії Menard (заснована у Японії) та Estée Lauder (заснована у Франції) застосовували *G. lucidum* для створення сонцезахисних кремів [141].

Міцелій макроміцетів використовують для детоксифікування та знебарвлювання стічних вод різного походження, зокрема, міських стічних вод [159, 160], стічних вод лікарень [161-163], текстильної промисловості [164, 165]), млина для оливкової олії [166-169], а також стічних вод від процесу ферментування м'яса [170-172].

Отже, макроміцети є цінним джерелом різноманітних за складом та структурою біологічно активних речовин. Деякі з них є характерними лише для метаболізму грибів відділів *Basidiomycota* та *Ascomycota*, зокрема, специфічні  $\beta$ -D-глюкани та їх похідні, певні терпеноїди, лектини тощо. Проте, високомолекулярні компоненти клітинних стінок макроміцетів здатні адсорбувати токсичні речовини не тільки при потрапленні в організм людини як частина раціону харчування. Макроміцети характеризуються адсорбційним типом харчування у природі, тому при наявності важких металів, радіонуклідів, токсинів у субстраті здатні накопичувати їх, що робить такі гриби небажаними і навіть небезпечними для вживання людиною [173]. Складнощі у відокремленні їстівних видів грибів від отруйних та антропогенне забруднення навколишнього середовища зумовлюють особливу актуальність використання штучного культивування грибів на екологічно чистих субстратах з метою використання як харчових продуктів чи їх інгредієнтів, дієтичних добавок та лікарських засобів [174, 175].

Пошук перспективних продуцентів БАР серед представників відділу *Basidiomycota* та *Ascomycota*, вивчення закономірностей росту та біосинтезу

цих компонентів, розробка біотехнологій отримання екологічно чистої біомаси грибів з використанням рослинної сировини – відходів сільського та лісового господарства і переробної харчової промисловості нашої країни дозволить отримати нові унікальні дієтичні добавки та новітні харчові інгредієнти з лікувально-профілактичними властивостями.

Проведений аналіз літературних даних свідчить про наявність результатів вивчення харчової цінності та лікувальних властивостей плодових тіл багатьох видів макроміцетів. При цьому, використання плодових тіл викликає певні труднощі: обмеження збору в природі внаслідок погіршення екологічної ситуації та скорочення площ природних лісів, тривалість процесу штучного культивування (1-5 місяців) та додаткові витрати на створення мікроклімату приміщення [71]. Глибинне культивування міцелію потребує менше часу та, відповідно, матеріальних витрат, дозволяє отримати продукт зі запланованим вмістом БАР.

У широкий спектр використовуваних відходів переробної промисловості для культивування міцелію макроміцетів не входять деякі продукти перероблення зернових культур: барда кукурудзи, багаса сорго, сухарна крихта, відходи з млина пшениці та жита III-ої категорії, а також аспіраційні відходи ячменю, які можна використовувати як основу рідких живильних середовищ для культивування лікарських макроміцетів. Зважаючи на те, що в Україні розвинуте виробництво хлібо-булочних виробів та пива з зернових культур, а також розвивається виробництво біоетанолу як відновлюваного компоненту палива, ці субстрати є легкодоступними та екологічно чистими. Тому вони є перспективними для використання в біотехнологіях культивування лікарських грибів, але це потребує визначення оптимальних біотехнологічних параметрів процесів, що обумовлюють максимальну біосинтетичну активність продуцентів.

Оглядові роботи за матеріалами розділу відображені в публікаціях: [176-178].

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hawksworth D. L. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species [Electronic resource] / D. L. Hawksworth, R. Lücking // Microbiol. Spectrum. – 2017. – Vol. 5, Iss. 4. – FUNK-0052-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
2. Rathore H. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review / H. Rathore, Sh. Prasad, S. Sharma // PharmaNutrition. – 2017. – Vol. 5, Iss. 2 – P. 35-46.
3. Soković M. Mushrooms as Sources of Therapeutic Foods / M. Soković, J. Glamočlija, A. Ćirić [et al.] // Handbook of Food Bioengineering series. – 2018. – Vol. 8 (Therapeutic Foods). – P. 141-178.
4. Wasser S. P. Medicinal Properties of Substances Occuring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review) / S. P. Wasser, A. L. Weis // Int. J. Med. Mushrooms. – 1999. – Vol. 1. – P. 31–62.
5. Федотов О. В. Регуляция синтеза полифенольных веществ некоторыми штаммами базидиомицетов / О. В. Федотов, А. К. Велигодская // Біологічний вісник МДПУ. – 2014. – № 1. – С. 35 –47.
6. Wasser S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S. P. Wasser // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 60, Iss. 3. – P. 258–274.
7. Wasser S. P. Dietary Supplements from Medicinal Mushrooms: Diversity of Types and Variety of Regulations / S. P. Wasser, E. Nevo, D. Sokolov [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. – 2000. – Vol.2. – P.1–19.
8. Erjavec J. Proteins of higher fungi – from forest to application / J. Erjavec, J. Kos, M. Ravnikar [et al.] // Trends Biotechnol. – 2012. – Vol. 30, Iss. 5. – P. 259–273.

9. Біологічно активні речовини рослин : (Конспект лекцій) / уклад.: М. М. Марченко, І. Д. Николюк; Чернів. нац. ун-т ім. Ю.Федьковича. – Чернівці : Рута, 2005. – 120 с.
10. Kim J. (1–3)(1–6)- $\beta$ -Glucan-enriched materials from *Lentinus edodes* mushroom as a high-fibre and low-calorie flour substitute for baked foods / J. Kim, S. M. Lee, I. Y. Bae [et al.] // J. Sci. Food Agric. – 2011. – Vol. 91. – P. 1915–1919.
11. Chan G. Ch-F. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells [Electronic resource] / G. Ch-F. Chan, W. K. Chan, D. M.-Y. Sze // J. Hematol. Oncol. – 2009. – Vol. 2. – doi: 10.1186/1756-8722-2-25
12. Smith J. E. Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments / J. E. Smith, N. J. Rowan, R. Sullivan; University of Strathclyde. – London: Cancer Research UK, 2002. – 260 p.
13. Zong A. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research / A. Zong, H. Cao, F. Wang // Carbohydr. Polym. – 2012. – Vol. 90, Iss. 4. – P. 1395–1410.
14. Chihara G. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing / G. Chihara, Y. Y. Maeda, J. Hamuro // Nature. – Vol. 1969, Iss. 222. – P. 687–688.
15. Zhang Y. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities (Review) / Y. Zhang, Sh. Li, X. Wang [et al.] // Food Hydrocoll. – 2011. – Vol. 25. – P. 196–206.
16. Zhang Y. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments / Y. Zhang, H. Kong, Y. Fang [et al.] // Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre. – 2013. – Vol. 1. – P. 53–71.
17. Клечак І. Р. Біотехнології на основі вищих базидіальних грибів роду *Coriolus* Quel / І. Р. Клечак, А. О. Антоненко // Наукові вісті НТУУ

- «КПІ». – 2012. – Т. 83, №3 (хімічні і біологічні науки і технології). – С. 41–49.
18. Wan J. M.-F. Polysaccharide Krestin (PSK) and Polysaccharopeptide PSP / J. M.-F. Wan // Handbook of Biologically Active Peptides (2-nd Edition) [ed. by Abba Kastin]. – 2013. – P. 180-184.
  19. Maehara Y. Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN): review of development and future perspectives / Y. Maeha, S. Tsujitani, H. Saeki // Surg. Today. – 2012. – Vol. 42. – P. 8–28.
  20. Mikiashvili N. Purification and Characterization of a Lectin Isolated from the Submerged Cultivated Mycelium of Grey Polypore *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill (*Aphyllphoromycetideae*) / N. Mikiashvili, V. Elisashvili, M. Worku [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. – 2009. – Vol. 11, Iss. 1. – P.61–68.
  21. Ветчинкина Е. П. Активность внутриклеточных лектинов *Lentinus edodes* на разных стадиях развития гриба / Е. П. Ветчинкина, В. Е. Никитина, О. М. Цивилев, Л. Б. Гарибова // ПБМ. – 2008. – Т.44, № 1. – С.76–83.
  22. Степанова Л. В. Выделение и характеристика лектина с поверхности мицелия *Grifola frondosa* (Fr.) S.F. Gray / Л.В. Степанова, В.Е. Никитина, А.С. Бойко // Микробиология. – 2007. – Т.76. – С.488–493.
  23. Xu X. Bioactive proteins from mushrooms / X. Xu, H. Yan, J. Chen [et al.] // Biotech. Adv. – 2011. – Vol. 29. – P. 667–674.
  24. Ng T. B. Peptides and proteins from fungi / T. B. Ng // Peptides. – 2004. – Vol. 25. – P. 1055–1073.
  25. Zhang G. Q. A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa* / G. Q. Zhang, J. Sun, H. X. Wang [et al.] // Acta Biochim. Pol. – 2009. – Vol. 56. – P. 415–421.
  26. Li Y. A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom

- Hericium erinaceum* [Electronic resource] / Y. Li, G. Zhang, T. B. Ng [et al.] // J. Biomed. Biotech. – 2010. – doi: 10.1155/2010/716515.
27. Zhang G. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom / G. Zhang, J. Sun, H. Wang [et al.] // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 17. – P. 775–781.
  28. Zhao S. A novel lectin with highly potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible wild mushroom *Russula delica* / S. Zhao, Y. C. Zhao, S. H. Li [et al.] // Glycoconj. J. – 2010. – Vol. 27. – P. 259–265.
  29. Li M. Purification and characterization of a laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum* / M. Li, G. Zhang, H. Wang [et al.] // J. Microbiol. Biotech. – 2010. – Vol. 20. – P. 1069–1076.
  30. Zhang G, First isolation and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima* / G. Zhang, J. Sun, H. Wang [et al.] // Process Biochem. – 2010. – Vol. 45. – P. 627–633.
  31. Zhang G. Q. A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from a white root fungus *Abortiporus biennis* / G. Q. Zhang, T. Tian, Y. P. Liu [et al.] // Process Biochem. – 2011. – Vol. 46. – P. 2336–2340.
  32. Xu W. Extract of *Pleurotus pulmonarius* suppresses liver cancer development and progression through inhibition of VEGF-induced PI3K/AKT signaling pathway [Electronic resource] / W. Xu, J. J. Huang, P. C. Cheung // PLOS One. – 2012. – Vol. 7. – e34406. – doi:10.1371/journal.pone.0034406.
  33. Zou YJ, Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Hericium coralloides* / Y. J. Zou, H. X. Wang, T. B. Ng [et al.] // J. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – P. 72–78.
  34. Wong J. H. Marmorin, a new ribosome inactivating protein with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mushroom *Hypsizigus marmoratus* / J. H. Wong, H. X. Wang, T. B. Ng // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 81. – P. 669–674.



35. Ферментативные системы высших базидиомицетов / [Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г., Трутнёва И. А.]. – К. : Наук. думка, 1989. – 280 с.
36. Mushrooms as functional foods / [ed. by Cheung P.C.K.]. – New York: Wiley, 2008. – 268 p.
37. Ribeiro B. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study / B. Ribeiro, P. Guedes de Pinhoa, P.B. Andrade [et al.] // Microchem. J. – 2009. – Vol. 93, Iss. 1. – P. 29–35.
38. Дудка И. А. Грибы. Справочник миколога и грибника / И. А. Дудка, С. П. Вассер. – К.: Наукова думка, 1987. – 534 с.
39. Wang X.-M. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography / X.-M. Wang, M. Yang, Sh.-H. Guan [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2006. – Vol. 41. – P. 838–844.
40. Yang M. Analysis of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry / M. Yang, X. Wang, Sh. Guan [et al.] // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2007. – Vol.18, Iss.5. – P.927–939.
41. Percario S. Antioxidant Activity of Edible Blushing Wood Mushroom, *Agaricus sylvaticus* Schaeff. (*Agaricomycetidae*) *In Vitro* / S. Percario, A. S. Naufal, M. S. Gennari, J. L. Gennari // Int. J. Med. Mushrooms. – 2009. – Vol. 11, Iss. 2. – P.133–140.
42. Ey J. Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine / J. Ey, E. Schoming, D. Taulbert // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55. – P. 6466–6474.
43. Ngo D.-H. Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives / D.-H. Ngo, S.-K. Kim // Adv. Food Nutr. Res. – 2014. – Vol. 73. – P. 15-31.
44. Hiranoa Sh. Chitin Biotechnology Applications / Sh. Hiranoa // Biotechnol. Annu. Rev. – 1996. – Vol. 2. – P. 237–258.

45. Огарков Б. Н. Грибы – защитники, целители и разрушители / Б. Н. Огарков, Г. Р. Огаркова, Л. В. Самусенок. – Иркутск : ГУ НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН, 2008. – 247 с.
46. Соломко Э. Ф. Пищевая ценность и лекарственные свойства культивируемых базидиальных макромицетов (С. 5-82) / А. С. Бухало, В. Г. Бабицкая, Н. А. Бисько // Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 1 / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев: Альтерпрес, 2011. – 212 с.
47. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems / S.P. Wasser // Int. J. Med. Mushrooms. – 2010. – Vol. 12. – P. 1–16.
48. Підгорський В. С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу : монографія / В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська, Т. П. Пирог; НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – К. : Наук. думка, 2010. – 328 с.
49. Круподьорова Т. А. Ріст *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. та *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. та синтез екзополісахаридів в умовах глибинного культивування / Т. А. Круподьорова // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 60–67.
50. Lee H. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics / H. Lee, M. Song, Y. Yu, S. Hwang // Biochem. Eng. J. – 2003. – Vol. 15, Iss. 2. – P. 93–99.
51. Mukhopadhyay R. A comprehensive analysis of the nutritional quality of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in deproteinized whey medium / R. Mukhopadhyay, A. K. Guha // LWT – Food Sci. Technol. – 2015. – Vol. 61, Iss. 2. – P. 339–345.

52. Cho K. Resource recovery using whey permeate to cultivate *Phellinus linteus* mycelium: Solid-state and submerged liquid fermentation / K. Cho, J. Lee, G. Han [et al.] // J. Dairy Sci. – 2015. – Vol. 98, Iss. 10. – P. 6739–6748.
53. Zhang Z. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey / G. Lv, H. Pan, A. Pandey [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2012. – Vol. 51, Iss. 5. – P. 1140–1146.
54. Inglet B. S. Cultivation of *Lentinus edodes* Mycelia Using Whey Permeate as an Alternative Growth Substrate / B. S. Inglet, M. Song, C. L. Hansen, S. Hwang // J. Dairy Sci. – 2006. – Vol. 89, Iss. 3. – P. 1113–1115.
55. Chen H. B. Effect of Using Whey in the Submerged Culture of *Grifola umbellata* / H. B. Chen, M. J. Chen, Ch. I. Chen [et al.] // J. Biotech. – 2010. – Vol. 150, Supplement. – P. 518.
56. Cui J. Characterisation and Bioactivity of Protein-Bound Polysaccharides from Submerged-Culture Fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 / J. Cui, K. K. Tha Goh, R. Archer, H. Singh // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 34. – P. 393–402.
57. Клечак І. Р. Особливості росту *Coriolus versicolor* у глибинній культурі / І. Р. Клечак, Н. Ю. Митропольська, Л. О. Антоненко, О. І. Нишпорська // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2009. – Т. 20, № 1. – С. 130–133.
58. Zhang Y. Quantification of key odor-active compounds of a novel nonalcoholic beverage produced by fermentation of wort by shiitake (*Lentinula edodes*) and aroma genesis studies / Y. Zhang, N. M. Hartung, M. A. Fraatz, H. Zorn // Food Res. Int. – 2015. – Vol. 70. – P. 23–30.
59. Ліновицька В. М. Ріст і біосинтетична активність *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray та *Schizophyllum commune* Fr. (Basidiomycota) у глибинній культурі / В. М. Ліновицька, А. С. Бухало // Ukr. Bot. J. – 2008. – Т. 65, № 1. – С. 116–123.
60. Xiao J. H. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using

- desirability functions / J. H. Xiao, D. X. Chen, W. H. Wan [et al.] // *Process Biochem.* – 2006. – Vol. 41, Iss. 8. – P. 1887–1893.
61. Thakkar A. P. Biocatalytic decolourisation of molasses by *Phanerochaete chrysosporium* / A. P. Thakkar, V. S. Dhamankar, B. P. Kapadnis // *Bioresour. Technol.* – 2006. – Vol. 97, Iss. 12. – P. 1377–1381.
  62. Xu X. The capability of *Inonotus obliquus* for lignocellulosic biomass degradation in peanut shell and for simultaneous production of bioactive polysaccharides and polyphenols in submerged fermentation / X. Xu, Y. Hu, L. Zhu // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* – 2014. – Vol. 45, Iss. 6. – P. 2851–2858.
  63. Пат. 84401 Україна, МПК A01G 1/04, C12N 1/00, C12R 1/645. Спосіб лабораторного культивування їстівних базидіальних грибів / Н. В. Дорошкевич, В. М. Шевкопляс; заявн. і власн. ДонНУ, заявка u201302650 від 04.03.2013, опубл. 25.10.2013, Бюл. № 20.
  64. Cheung P. C.-K. Chemical evaluation of some lesser known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soy milk waste / P. C.-K. Cheung // *Food Chem.* – 1997. – Vol. 60, Iss. 1. – P. 61–65.
  65. Davitashvili E. Evaluation of Higher Basidiomycetes Mushroom Lectin Activity in Submerged and Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Residues / E. Davitashvili, E. Kapanadze, E. Kachlishvili [et al.] // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 2008. – Vol. 10, Iss. 2. – P. 171–179.
  66. Metreveli E. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulose and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpes lacteus* and *Schizophyllum commune* / E. Metreveli, E. Kachlishvili, S. W. Singer, V. Elisashvili // *Bioresour. Technol.* – 2017. – Vol. 241. – P. 652–660.
  67. Songulashvili G. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes / G. Songulashvili,

- V. Elisashvili, S. P. Wasser [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – Vol. 41. – P. 57–61.
68. Shen H. Sh. Biodegrading Wheat Bran with *Agaricus blazei* and Its Effects on Intestinal Development Identified with Mice / H. Sh. Shen, J. C. Chen, L. Wu [et al.] // *J. Integr. Agric.* – 2012. – Vol. 11, Iss. 3. – P. 456–464.
  69. Yang P. Recombinant multi-functional cellulase activity in submerged fermentation of lignocellulosic wastes / P. Yang, L. Guo, Sh. Cheng [et al.] // *Renew. Energy.* – 2011. – Vol. 36, Iss. 12. – P. 3268–3272.
  70. Клечак И. Р. Особенности биодеструкции виноградной выжимки в процессе роста мицелия *Lentinus edodes*. И. Р. Клечак, Н. А. Бисько, В. Т. Билай // *Микология и фитопатология.* – 1999. – Т. 33. № 1. – С. 44–46.
  71. Круподьорова Т. А. Альтернативні субстрати для культивування лікарських та їстівних грибів / Т. А. Круподьорова, В. Ю. Барштейн // *Мікробіологія і біотехнологія.* – Т. 17, № 1. – 2012. – С. 47–56.
  72. Пат. 63646 Україна, МПК A01G 1/04. Субстрат для вирощування грибів / Т. А. Круподьорова, В. Ю. Барштейн; заявн. і власн. ДУ «ІХБГ НАН України», заявка u201105462 від 29.04.2011, опубл. 10.10.2011, Бюл. № 19.
  73. Xiao J. H. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions / J. H. Xiao, D. X. Chen, W. H. Wan [et al.] // *Process Biochem.* – 2006. – Vol. 41, Iss. 8. – P. 1887–1893.
  74. Papaspyridi L. M. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture / L. M. Papaspyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou [et al.] // *Biochem. Eng. J.* – 2010. – Vol. 50, Iss. 3. – P. 131–138.
  75. Shu Ch. H. Production of schizophyllan glucan by *Schizophyllum commune* ATCC 38548 from detoxificated hydrolysate of rice hull / Ch. H. Shu, H. J. Hsu // *J. Taiwan Inst. Chem. E.* – 2011. – Vol. 42. – P. 387–393.

76. Freixo M. R. Production of polygalacturonase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behaviour on immobilized metal chelates / M. R. Freixo, A. Karmali, J. M. Arteiro // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 35. – 475–484.
77. Kurbanoglu E. B. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate / E. B. Kurbanoglu, O. F. Algur, A. Zulkadir // Ind. Crops Prod. – 2004. – Vol. 19, Iss. 3. – P. 225–230.
78. Elisashvili V. *Lentinus edodes* and *Pleurotus species* lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition / V. Elisashvili, M. Penninckx, E. Kachlishvili [et al.] // Bioresour. Technol. – 2008. – Vol. 99. – P. 457–462.
79. Bosse A. K. Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes / A. K. Bosse, M. A. Fraatz, H. Zorn // Food Chem. – 2013. – Vol. 141. – P. 2952–2959.
80. Jelacic I. Whey based beverages – new generation of dairy products / I. Jelacic, R. Bozanic, L. Tratnik // Mljekarstvo. – 2008. – Vol. 58, Iss. 3. – P. 257–274.
81. Jelen P. Whey processing. Utilization and Products / Fuquay J. F., Fox P. F., McSweeney P. L. H. (eds.) // Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). 2011. – Vol. 4. – P. 731–737.
82. Дробот В. І. Технологія хлібопекарського виробництва / В. І. Дробот. – К: НУХТ, 2002. – 363 с.
83. Prazeres A. R. Cheese whey management: A review / A. R. Prazeres, F. Carvalho, J. Rivas // J. Environ. Manage. – 2012. – Vol. 110. – P. 48–68.
84. ГОСТ 30561-2013. Меласса свекловичная. Технические условия. – [введён в действие 2014-07-01]. – М.: Стандартинформ, 2014. – 20 с. (Межгосударственный стандарт)

85. ГОСТ Р 54902-2012. Меласса тростникового сахара-сырца. Технические условия. – [введён в действие 2013-07-01]. – М.: Стандартинформ, 2012. – 8 с. (Национальный стандарт Российской Федерации)
86. Abd-Alla M. H. Enhancement of biodiesel, hydrogen and methane generation from molasses by *Cunninghamella echinulata* and anaerobic bacteria through sequential three-stage fermentation / M. H. Abd-Alla, M. M. Khalil Bagy, F. M. Morsy, E. A. Hassan // Energy. – 2014. – Vol. 78. – P. 543–554.
87. Tyagi N. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization / N. Tyagi, S. Suresh // J. Clean. Prod. – 2016. – Vol. 112, Part 1. – P. 71–80.
88. Chaisu K. Optimization Lactic Acid Production from Molasses Renewable Raw Material through Response Surface Methodology with *Lactobacillus Casei* M-15 / K. Chaisu, A. L. Charles, Y.-K. Guu // APCBEE Procedia. – 2014. – Vol. 8. – P. 194–198.
89. Статистичний збірник України. Україна у цифрах 2015 / За ред. І. М. Жук. – К. : Державна служба статистики України, 2016. – 239 с.
90. Зінченко О. І., Коротєєв А. В., Каленська С. М. [та ін.] Рослинництво / За ред. О. І. Зінченка. Практикум. – Вінниця : Нова Книга, 2008. – 536 с.
91. Poppe J. Use of agricultural waste materials in the cultivation of mushrooms / J. Poppe // Science and Cultivation of Edible Fungi (Ed. by L. Van Griensven). – Rotterdam: Balkema, 2000. – P. 3–23.
92. Кузнецова І. А. Вплив високих та низьких температур на вихід протеїназ молокозсідалної дії у гриба *Irpex lacteus* Fr. / І. А. Кузнецова // Вісник ХНАУ. Серія Біологія. – 2008. – Т. 4, Вип. 2. – С. 96–100.
93. Кадималиев Д. А. Влияние различно замещенных пирролохинолонов на физиолого-биохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* / Д. А. Кадималиев, И. С. Степаненко, О. С. Надежина, С. А. Ямашкин // Микология и фитопатология. – 2014. – Т. 48, Вып. 5. – С. 309–314.

94. Цивилева О. М. Внеклеточные лектины *Lentinus edodes*: характеристика, свойства и предполагаемые функции: автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия», 03.00.07 «Микробиология» / Ольга Михайловна Цивилева. – Саратов, 2008. – 47 с.
95. Akpinar-Bayizit A. Fungal lipids: the biochemistry of lipid accumulation / A. Akpinar-Bayizit // IJCEA. – 2014. – Vol. 5, Iss. 5. – P. 409–414.
96. Senik S. V. Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes* / S. V. Senik, L. G. Maloshenok, E. R. Kotlova [et al.] // Phytochemistry. – 2015. – Vol. 117. – P. 34–42.
97. Mikhailova R. V. Proteolytic Enzymes of Mycelial Fungi / R. V. Mikhailova // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – № 3. – С. 47–62.
98. Мацелюх О. В. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів / О. В. Мацелюх // МЖ. – 2010. – Т. 72, № 4. – С. 56–73.
99. Silva R. R. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium* / R. R. Silva, L. C. G. Oliveira, M. A. Juliano [et al.] // Food Chem. – 2017. – Vol. 225. – P. 45–54.
100. Elisashvili V. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes / V. Elisashvili, E. Kachlishvili, M. Penninckx // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 35. – P. 1531–1538.
101. Kobakhidze A. Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes / A. Kobakhidze, M. Asatiani, E. Kachlishvili, V. Elisashvili // Ann. Agrar. Sci. – 2016. – Vol. 14, Iss. 3. – P. 169–176.



102. Papinutti L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex / L. Papinutti // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 1941–1946.
103. El-Naas M. H. Aerobic biodegradation of BTEX: progresses and prospects / M. H. El-Naas, J. A. Acio, A. E. El Telib // J. Environ. Chem. Eng. – 2014. – Vol. 2. – P. 1104–1122.
104. Bailey J. E. Biochemical Engineering Fundamentals / J. E. Bailey, D. F. Ollis. – NY : McGraw-Hill, 1986. – 984 p.
105. Колодязная В. С. Пищевая химия: Учеб. пособие / В. С. Колодязная. – СПб. : СПбГАХПТ, 1999. – 140 с.
106. Bellisle F. Functional Food Science in Europe / F. Bellisle, A. T. Diplock, G. Hornstra [et al.] // Br. J. Nutr. – 1998. – Vol. 80, Supplement 1. – P. S1–S193.
107. Ulziijargal E. Quality of bread supplemented with mushroom mycelia / E. Ulziijargal, J. H. Yang, L. Y. Lin [et al.] // Food Chem. – 2013. – Vol. 138, Iss.1. – P.70–76.
108. Lin L.-Y. Quality of Shiitake Stipe Bread [Electronic resource] / L.-Y. Lin, Y.-H. Tseng, R.-Ch. Li, J.-L. Mau // J. Food Process. Preserv. – 2008. – doi: 10.1111/j.1745-4549.2008.00229.x
109. Кравченко О. А. Возможность применения муки из грибов вешенка в качестве биологически активной добавки при производстве хлебобулочных изделий / О. А. Кравченко, Э. Е. Хачатурян, Ю. Ф. Росляков // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2009. – №4. – С.50-51.
110. Tseng Y.-H. Quality of Bread Supplemented with Silver Ear [Electronic resource] / Y.-H. Tseng, J.-H. Yang, R.-Ch. Li, J.-L. Mau // J. Food Qual. – 2010. – DOI: 10.1111/j.1745-4557.2009.00288.x

111. Heo S. Utilization of *Lentinus edodes* mushroom  $\beta$ -glucan to enhance the functional properties of gluten-free rice noodles / S. Heo, S. Jeon, S. Lee // Food Sci. Technol. – 2014. – V.5, Iss.2. – P. 627–631.
112. Рудавська Г. Б. Харчові концентрати: підручник / Г. Б. Рудавська, Є. В. Тищенко ; Київський національний торговельно-економічний ун-т. – К.: [б.в.], 2001. – 320 с.
113. Пат. № 69510 Україна, МПК A23L 1/39. Харчовий концентрат функціонального призначення – суп грибний / В. Ю. Барштейн, Т. А. Круподьорова, О. В. Сабибін; заявн. і власн. ДУ «ІХБГ НАН України», заявка u201114021 від 28.11.2011, опубл. 24.04.2012 р., Бюл. № 8.
114. Ribeiro A. Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients / A. Ribeiro, G. Ruphuu, J. C. Lopes [et al.] // Food Chem. – 2015. – Vol. 188. – P. 612–618.
115. Александрова Л. И. Исследование возможности использования экстрактов гриба *Boletus edulis* при производстве функциональных молочных продуктов / Л. И. Александрова, Л. А. Забодалова, Н. Н. Скворцова // Вестник ВГУИТ. – 2016. – Т. 68, № 2. – С. 131–139.
116. Pat. 5565625 Japan, IPC A23L1/39. Process for making Worcestershire sauce, and Worcestershire sauce obtained by the same / Tokumitsu M., Mariko T., Kenichi T. [et al.]; applicant and patent owner Mukogawa Gakuin, Ikari Sauce Co LTD. – № 20100190517 20100827 ; appl. 27.08.10 ; publ. 06.08.14.
117. Zeng H. B. Study on Development of *Cordyceps militaris* Health Vinegar / H. B. Zeng, T. H. Li, Y. J. Zhong Y.J. [et al.] // Food Sci. – 2009. – Vol. 30, Iss. 2. – P.289–291.
118. Peshuk L. Creation of functional meat products with the use of biomass of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.)P. Kumm., cultivated by meal / L. Peshuk, O.

- Haschuk, T. Krupodorova // The Second North and East European Congress on Food (NEEFood-2013). – 26-29 May 2013. – K.: NUFT, 2013. – P. 214.
119. Pat. 101735918 China, IPC A61K36/899; A61P1/14; A61P13/12; A61P3/06; A61P37/04; A61P39/02; A61P39/06; A61P9/12; C12G3/02; C12G3/06. Selenium-rich health wine and production method thereof / Liu Q.; applicant and patent owner Liu Q. – № 20081230865 20081113 ; appl. 13.11.08 ; publ. 23.01.13.
  120. Pat. 3362311 Japan, IPC C12G1/02. Method for producing wine and wine obtained by the same / Masahiro O., Tokumitsu O.; applicant and patent owner Mukogawa Gakuin. – № 20000105454 20000406 ; appl. 06.04.00 ; publ. 07.01.03.
  121. Okamura-Matsui T. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages / T. Okamura-Matsui, T. Tomoda, Sh. Fukuda, M. Ohsugi // J. Mol. Catal. B: Enzym. – 2003. – Vol. 23, Iss. 2–6. – P. 133–144.
  122. Pat. 2005210939 Japan, IPC C12G3/12. Method for Producing Alcoholic Drink / Ryuichi T., Junji W., Atsutake K.; applicant and patent owner Sapporo Breweries. – № 20040019849 20040128 ; appl. 28.01.04 ; publ. 11.08.05.
  123. Kang D. C. Preparation of Calcium-enriched Soybean Milk with Golden Mushroom Mycelium in Liquid Culture / D. C. Kang, R. L. Fang, Sh. M. Wang, X. Q. Lu // Food Sci. – 2005. – Vol. 26, Iss. 2. – P. 273–275.
  124. Мишарина Т. А. Состав летучих компонентов сушеных белых грибов и вешенки / Т. А. Мишарина, С. М. Мухутдинова, Г. Г. Жарикова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 5 – С. 606–611.
  125. Mau J.-L. Flavor Compounds in Straw Mushrooms *Volvariella volvacea* Harvested at Different Stages of Maturity / J.-L. Mau, Ch.-Ch. Chyau, J.-

- Y. Li, Y.-H. Tseng // J. Agric. Food Chem. – 1997. – Vol. 45, Iss. 12. – P. 4726–4729.
126. Бурлака О. М. Рослинні біотехнології: біофортифікація харчових рослин / О. М. Бурлака, Б. В. Сорочинський. – К. : ДІА, 2010. – 88 с.
  127. Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів: Закон України від 23.12.1997, № 771/97-ВР // Відомості Верховної Ради України. – 1997. – № 19. – Ст. 98.
  128. Cebon J. Cancer vaccines: Where are we going? / J. Cebon // Asia Pac. J. Clin. Oncol. – 2010. – Vol. 6, Iss. s1. – P. S9–S15.
  129. Palucka K. Cancer immunotherapy via dendritic cells / K. Palucka, J. Banchereau // Nat. Rev. Cancer. – 2012. – Vol. 12. – P. 265–277.
  130. Yadav D. K. Vaccine Therapy for Pancreatic Cancer: A Battle against Deadly Cancer / D. K. Yadav, C. Lu, R. K. Yadav // J. Cancer Sci. Ther. – 2014. – Vol. 6. – P. 268–277.
  131. Артамонова Г. Б. Оцінка протипухлинної ефективності полісахаридної фракції з плодового тіла гриба *Lentinus edodes* і глікопептидної вакцини на різних моделях пухлинного росту. Автореф. дис... канд. біол. наук. : 14.01.07 онкологія. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Київ, 2011. – 20 с.
  132. Liao Sh.-F. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes / Sh.-F. Liao, Ch.-H. Liang, M.-Y. Ho [et al.] // PNAS. – 2013. – Vol. 110, Iss. 34. – P. 13809–13814.
  133. Chu C. L. A novel adjuvant Ling Zhi-8 for cancer DNA vaccines / C. L. Chu, D. C. Chen, C. C. Lin // Hum. Vaccin. – 2011. – Vol. 7. – P. 1161–1164.
  134. Блюм Я. Б. «Зелений» синтез наночастинок благородних металів та напівпровідникових нанокристалів CdS за допомогою біологічної сировини / Я. Б. Блюм, Я. В. Пірко, О. М. Бурлака [та ін.] // Наука та інновації. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 59–71.

135. Borovaya M. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum dots by using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm / M. Borovaya // Biotechnol. Biotechnol. Equip. – 2015. – Vol. 29, Iss. 6. – P. 1156–1163.
136. Al-Bahrani R. Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria / R. Al-Bahrani, J. Raman, H. Lakshmanan [et al.] // Mater. Lett. – 2017. – Vol. 186. – P. 21–25.
137. Bhat R. Photo-bio-synthesis of irregular shaped functionalized gold nanoparticles using edible mushroom *Pleurotus florida* and its anticancer evaluation / R. Bhat, V. G. Sharanabasava, R. Deshpande [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B. – 2013. – Vol. 125. – P. 63–69.
138. Sen I. K. Green synthesis of silver nanoparticles using glucan from mushroom and study of antibacterial activity / I. K. Sen, A. K. Mandal, S. Chakraborti [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2013. – Vol. 62. – P. 439–449.
139. Chan Y. S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Schizophyllum Commune* and *In-vitro* Antibacterial and Antifungal Activity Studies / Y. S. Chan, M. D. Mashitah // J. Phys Sci. – 2013. – Vol. 24, Iss. 2. – P. 83–96.
140. Metuku R. P. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Schizophyllum radiatum* HE 863742.1: their characterization and antimicrobial activity / R. P. Metuku, S. Pabba, S. Burra [et al.] // 3 Biotech. – 2014. – Vol. 4, Iss. 3. – P. 227–234.
141. Taofiq O. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics – A review / O. Taofiq, A. M. Gonzalez-Paramas, A. Martins [et al.] // Ind. Crops Prod. – 2016. – Vol. 90. – P. 38–48.
142. Park K. M. Evaluation of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory property from mycelium culture extracts [Electronic resource] / K. M. Park, K. M. Kwon, S. H. Lee // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2015. – doi: 10.1155/2015/616298

143. Chien C. C. Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms / C. C. Chien, M. L. Tsai, C. C. Chen [et al.]. // *Mycopathologia*. – 2008. – Vol. 166. – P. 117–120.
144. Hapsari R. Formulation and evaluation of antioxidant and tyrosinase inhibitory effect from gel containing the 70 % ethanolic *Pleurotus ostreatus* extrac / R. Hapsari, B. Elya, J. Amin // *Int. J. Med. Arom. Plants*. – 2012. – Vol. 2. – P. 135–140.
145. Yoon K. N. Detection of phenolic compounds concentration and evaluation of antioxidant and antityrosinase activity of various extract from *Lentinus edodes* / K. N. Yoon, N. Alam, J. S. Lee [et al.] // *World Appl. Sci. J.* – 2011. – Vol. 12. – P. 1851–1859.
146. Jun H. J. *p*-Coumaric acid inhibition of CREB phosphorylation reduces cellular melanogenesis / H. J. Jun, J. H. Lee, B. R. Cho [et al.] // *Eur. Food Res. Technol.* – 2012. – Vol. 235. – P. 1207–1211.
147. Kwak J. Y. Ascorbyl coumarates as multifunctional cosmeceutical agents that inhibit melanogenesis and enhance collagen synthesis / J. Y. Kwak, S. Park, J. K. Seok [et al.] // *Arch. Dermatol. Res.* – 2015. – Vol. 307. – P. 635–643.
148. Thangboonjit W. Comparative evaluation of antityrosinase and antioxidant activities of dietary phenolics and their activities in melanoma cells exposed to UVA / W. Thangboonjit, S. Limsaeng-u-rai, T. Pluemsamran, U. Panich // *Siriraj Med. J.* – 2014. – Vol. 66. – P. 5–10.
149. Chaiprasongsuk A. Photoprotection by dietary phenolics against melanogenesis induced by UVA through Nrf2-dependent antioxidant responses / A. Chaiprasongsuk, T. Onkoksoong, T. Pluemsamran, S. Limsaengurai, U. Panich // *Redox Biol.* – 2016. – Vol. 8. – P. 79–90.
150. Kumar K. J. In vitro and in vivo studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid: a novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases / K. J. Kumar, M. G. Vani, S. Y. Wang [et al.] // *Biofactors*. – 2013. – Vol. 39. – P. 259–270.

151. Su T. R. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in B16F10 cells / T. R. Su, J. J. Lin, C. C. Tsai [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14. – P. 20443–20458.
152. Kim B. N-Nicotinoyl tyramine a novel niacinamide derivative, inhibits melanogenesis by suppressing MITF gene expression / B. Kim, S. H. Lee, K. Y. Choi, H. S. Kim // Eur. J. Pharmacol. – 2015. – Vol. 764. – P. 1–8.
153. Chen Y. S. Hispolon decreases melanin production and induces apoptosis in melanoma cells through the downregulation of tyrosinase and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expressions and the activation of caspase-3, -8 and 9 / Y. S. Chen, S. M. Lee, C. C. Lin, C. Y. Liu // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol. 15. – P. 1201–1215.
154. Bae J. T. Production of exopolysaccharide from mycelial culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts / J. T. Bae, G. S. Sim, D.H. Lee [et al.]. // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – Vol. 251. – P. 347–354.
155. Kim Y. J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid / Y. J. Kim // Biol. Pharmaceut. Bull. – 2007. – Vol. 30. – P. 1052–1055.
156. Seok J. K. *p*-Coumaric acid attenuates UVB-induced release of stratifin from Keratinocytes and indirectly regulates Matrix Metalloproteinase 1 release from fibroblasts / J. K. Seok, Y. C. Boo // Korean J. Physiol. Pharmacol. – 2015. – Vol. 19. – P. 241–247.
157. Bae J. Y. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation / J. Y. Bae, J. S. Choi, S. W. Kang [et al.]. // Exp. Dermatol. – 2010. – Vol. 19. – P. e182–e190.
158. Obayashi K. l-Ergothioneine scavenges superoxide and singlet oxygen and suppresses TNF- $\alpha$  and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts / K. Obayashi, K. Kurihara, Y. Okano [et al.]. // J. Cosmet. Sci. – 2005. – Vol. 56. – P. 17–27.

159. Cruz-Morató C. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor / C. Cruz-Morató, L. Ferrando-Climent, S. Rodríguez-Mozaz // Water Res. – 2013. – Vol. 47. – P. 5200–5210.
160. Font X. Treatment of toxic industrial wastewater in fluidized and fixed-bed batch reactors with *Trametes versicolor*: influence of immobilization / X. Font, G. Caminal, X. Gabarell, T. Vicent // Environment. Technol. – 2006. – Vol. 27. – P. 845–854.
161. Cruz-Morató C. Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds / C. Cruz-Morató, D. Lucas, M. Llorca [et al.] // Sci. Total Environ. – 2014. – Vol. 493. – P. 356–376.
162. Gros M. Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products / M. Gros, C. Cruz-Mortao, E. Marco-Urrea [et al.] // Water Res. – 2014. – Vol. 60. – P. 228–241.
163. Ferrando-Climent L. Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater / L. Ferrando-Climent, C. Cruz-Morató, E. Marco-Urrea [et al.] // Chemosphere. – 2015. – Vol. 136. – P. 9–19.
164. Rodríguez-Couto S. A promising inert support for laccase production and decolouration of textile wastewater by the white-rot fungus *Trametes pubescens* / S. Rodríguez-Couto // J. Hazard. Mater. – 2012. – Vol. 233–234. – P. 158–162.
165. Libra J. A. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions / J. A. Libra, M. Borchert, S. Banit // Biotechnol. Bioeng. – 2003. – Vol. 82. – P. 736–744.



166. Nogueira V. Biological treatment with fungi of olive mill wastewater pre-treated by photocatalytic oxidation with nanomaterials / V. Nogueira, I. Lopes, A. C. Freitas [et al.] // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2015. – Vol. 115. – P. 234–242.
167. Ntougias S. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes / S. Ntougias, P. Baldrian, C. Ehalt [et al.] // *Bioresour. Technol.* – 2015. – Vol. 189. – P. 121–130.
168. Ruiz J. C. Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavidobrunnea* / J. C. Ruiz, T. Rubia, J. Pérez, J. M. Lopez // *FEMS Microbiology Letters*. – 2002. – Vol. 212, Iss. 1. – P. 41–45.
169. Daâssi D. Olive oil mill wastewaters: Phenolic content characterization during degradation by *Coriolorhiza gallica* / D. Daâssi, J. Lozano-Sánchez, I. Borrás-Linares // *Chemosphere*. – 2014. – Vol. 113. – P. 62–70.
170. Rioja R. Biological decolourisation of wastewater from molasses fermentation by *Trametes versicolor* in an airlift reactor / R. Rioja, M. T. García, M. Peña, G. González // *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* – 2008. – Vol. 43. – P. 772–778.
171. Kumar V. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi / V. Kumar, L. Wati, P. Nigam [et al.] // *Process Biochem.* – 1998. – Vol. 33, Iss. 1. – P. 83–88.
172. Raghukumar Ch. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat / Ch. Raghukumar, C. Mohandass, Sh. Kamat, M. S. Shailaja // *Enzyme Microb. Technol.* – 2004. – Vol. 35, Iss. 2–3. – P. 197–202.

173. Барабанова Л. В. Оценка мутагенной активности накопленных дикорастущими съедобными грибами радионуклидов на территории Ленинградской области / Л. В. Барабанова, Д. М. Иванов // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 661–663.
174. Щеглов А. И. Грибы – биоиндикаторы техногенного загрязнения / А. И. Щеглов, О. Б. Цветнова // Природа. – 2002. – № 11. – С. 39–46.
175. Oolbekkink G. T. Radioactive Caesium from Chernobyl in Fungi / G. T. Oolbekkink, Th. W. Kuiper // Mycologist. – 1989. – Vol. 3, Iss. 1. – P. 3–6.
176. Иванова Т. С. Біологічно активні речовини грибів відділу *Basidiomycota* (Огляд) / Т. С. Иванова, Н. А. Бісько, В. Ю. Барштейн, Т. А. Круподьорова // Проблеми харчування. – 2010. – Т. 22, №1–2. – С. 42–47.
177. Ivanova T. S. Anticancer substances of mushroom origin / T. S. Ivanova, T. A. Krupodorova, V. Yu. Barshteyn [et al.] // Exp. Oncol. – 2014. – Vol. 36, Iss.1. – P. 1–9.
178. Ivanova T. S. Mushrooms as a component of functional foods / Plant Biology and Biotechnology: 2-nd Conference of Young Scientists, 23-24 December 2013. – Kyiv, 2013. – P. 76.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

При виконанні роботи ми використовували комплекс мікологічних, фізико-хімічних, біохімічних, мікробіологічних і статистичних методів досліджень. Більшість застосованих у роботі методів є загальноприйнятими при роботі з чистими культурами мікроорганізмів та грибів. Методи, застосовані при проведенні скринінгу культур на нових живильних середовищах, при дослідженні динаміки глибинного культивування, при аналізуванні складу субстратів та отриманої біомаси макроміцетів, а також при визначенні гемаглютинувальної та антимікробної активностей, наводимо у цьому розділі.

#### 2.1. Види та штами макроміцетів

Штами видів лікарських макроміцетів (Табл. 2.1) відділів *Basidiomycota* та *Ascomycota* були надані з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІВК) [1]. Обрані види та штами відомі як продуценти харчової біомаси та біологічно активних речовин. За походженням 3 штами базидієвих макроміцетів виділені з території України у 1995-2005 роках, інші штами грибів отримані від установ Білорусі, Росії, Германії, Ізраїлю, Кореї та Сполучених Штатів Америки у 1971-2010 роках (табл. 2.1).

В обговореннях досліджень враховувалось, що назви родів у латинській мові мають жіночий, чоловічий або середній рід, належність до яких перевірялася у базі даних MycoBank [2]. Виявилося, що роди *Cordyceps*, *Ophiocordyceps*, *Flammulina*, *Grifola*, *Trametes* та *Lentinula* вживаються в мові

як жіночий рід, *Pleurotus* – як чоловічий рід, а *Ganoderma* та *Schizophyllum* – як середній рід.

Таблиця 2.1

**Список досліджуваних видів та штамів лікарських макроміцетів  
із колекції культур ІВК [1]**

| Вид гриба                      | № штаму | Походження штаму                                                                                                                                     |
|--------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Cordyceps militaris</i>     | 1862    | Міжнародний центр спорових рослин і грибів. Інститут еволюції, Хайфського університету, Ізраїль, 2005                                                |
| <i>Flammulina velutipes</i>    | 1878    | Донецький національний університет, м. Донецьк, Україна, на <i>Robinia pseudoacacia</i> , 2005                                                       |
| <i>Ganoderma applanatum</i>    | 1701    | Інститут лісу Національної академії наук Білорусі, м. Гомель, Білорусь, 2000                                                                         |
| <i>Ganoderma lucidum</i>       | 1900    | Mycotech Biological, Inc., м. Дріпін Спрінгс, штат Техас, Сполучені Штати Америки, 2002                                                              |
| <i>Grifola frondosa</i>        | 976     | Weser-Champignon Dohme GmbH & Co., Німеччина, 1996, Nocuto Corporation, Японія                                                                       |
| <i>Lentinula edodes</i>        | 502     | Інститут рослинництва, м. Пхеньян, Північна Корея, 1990                                                                                              |
| <i>Ophiocordyceps sinensis</i> | 1928    | Aloha medicinal Inc., 2010, м. Карсон-Сіті, штат Невада, Сполучені Штати Америки                                                                     |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>     | 551     | Асоціація грибників Західної України, м. Львів, Україна, 1995                                                                                        |
| <i>Schizophyllum commune</i>   | 1768    | Дарниця, м. Київ, Україна, на <i>Pinus</i> sp., 2001                                                                                                 |
| <i>Trametes versicolor</i>     | 353     | Ботанічний інститут ім. В. Л. Комарова Російської академії наук, м. Санкт-Петербург, Російська Федерація, 1971, м. Москва, Російська Федерація, 1961 |

У табл. 2.2 наведене (за он-лайн базою даних МусоBank Міжнародної мікологічної асоціації [2]) систематичне положення досліджуваних видів грибів, що належать до 8 родів, 8 родин, 3 порядків, 2 класів, 2 відділів.

Таблиця 2.2

**Систематичне положення макроміцетів, використаних в роботі**

| Порядок                            | Родина                      | Вид                                                                                  |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Відділ <i>Ascomycota</i></b>    |                             |                                                                                      |
| <b>Клас <i>Sordariomycetes</i></b> |                             |                                                                                      |
| <i>Hypocreales</i>                 | <i>Clavicipitaceae</i>      | <i>Cordyceps militaris</i> (L.) Link                                                 |
|                                    | <i>Ophiocordycipitaceae</i> | <i>Ophiocordyceps sinensis</i> (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora |
| <b>Відділ <i>Basidiomycota</i></b> |                             |                                                                                      |
| <b>Клас <i>Agaricomycetes</i></b>  |                             |                                                                                      |
| <i>Agaricales</i>                  | <i>Physalacriaceae</i>      | <i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer                                          |
|                                    | <i>Pleurotaceae</i>         | <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.                                          |
|                                    | <i>Schizophyllaceae</i>     | <i>Schizophyllum commune</i> Fr.                                                     |
| <i>Polyporales</i>                 | <i>Fomitopsidaceae</i>      | <i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray                                                |
|                                    | <i>Ganodermataceae</i>      | <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                                             |
|                                    |                             | <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.                                          |
|                                    | <i>Polyporaceae</i>         | <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd                                                |
|                                    |                             | <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler                                               |

Слід зазначити, що досить часто в літературі застосовуються синонімічні родові назви для видів *Cordyceps sinensis* замість *Ophiocordyceps sinensis* (сучасна назва з 2007р. [2]) та *Lentinus edodes* замість *Lentinula edodes* (переіменовано у 1976р. [2]), також інколи вживається синонім *Coriolus versicolor* для виду *Trametes versicolor* (назва введена у 1920р. [2]).

Культури грибів зберігали у скошених пробірках на агаризованому середовищі з пивним сушлом при температурі 4 °C, пересівали один раз на 12 місяців.

## **2.2. Культивування міцелію макроміцетів на продуктах перероблення зернових культур**

### **2.2.1. Культивування в стаціонарних умовах**

На етапі первинного скринінгу субстратами для поверхневого культивування досліджуваних видів грибів були виробничо-технологічні відходи виробництва харчових продуктів України, а також відходи сировини, яку використовують в енергетиці [3]: цілі та мелені відходи III-ої категорії млина зернових культур ПрАТ «Київмлин» (м. Київ), аспіраційні відходи ячменю ПАТ «Оболонь» (м. Київ), сухарна крихта з суміші хлібів із пшеничного та житнього борошна ПАТ «Київхліб» (м. Київ), висушений осад післяспиртової барди кукурудзи ДП «Немирівський спиртовий завод» (Вінницька обл., м. Немирів) та висушена подрібнена багаса сорго ТОВ «Компанія «Еко-Енергія» (Сумська обл., Лебединський р-н, с. Будилка).

В процесі виділення та очищення етилового спирту з зерна кукурудзи утворюється побічний продукт – післяспиртова барда, що містить всі сухі речовини бражки, залишкові кількості води та максимально допустимий вміст спирту 0,015 % об. [4]. Для зберігання та подальшого використання осад зернової барди зневоднюють та сушать. На ДП «Немирівський спиртовий завод» (м. Немирів, Вінницька обл.) утворюється 50 тон сухого осаду барди.

Сік із стебел *Sorghum saccharatum* (L.) Moench (цукрового сорго) – традиційна сировина для виробництва біоетанолу, сиропу та ряду інших продуктів [4]. Сік цукрового сорго отримують механічним подрібненням

стебел та віджимом, після цього залишається багаса, яку зберігають та використовують у вигляді спресованих пелет. На ТОВ «Компанія «Еко-енергія» (с. Будилка, Сумська обл.) планується утворення 30 тис. тон багаси сорго на рік.

На млині, де виробляється борошно з жита та пшениці, утворюються відходи I, II і III категорії. Їх класифікують за наявністю в них зерна: I категорія – вміст зерна 10-30 % та пил оббивальних машин (білий), II категорія – вміст зерна (2-10) % та пил сірий, III категорія – вміст зерна не більше 2 %, пил аспіраційний та оббивальний (чорний) [5]. Відходи I та II категорії використовують для корму тварин, відходи III категорії для кормів непридатні. Відходи III категорії ПрАТ «Київмлин» досягають 70 т на місяць при очищенні жита та пшениці.

Аспіраційні відходи ячменю на ПАТ «Оболонь» (м. Київ) утворюються в об'ємі 20 т на місяць при доробці зерна та солоду. До складу аспіраційних відходів ячменю входять: частинки дробленого солоду, лушпиння, ендосперму, оболонки, ростки та борошно, а також пил, що утворюється внаслідок переміщення солоду під тиском по зернопроводам пневмотранспорту і роботи аспіраційних систем солодополірувальних машин та вібраційних сит [6].

На заводах з виробництва хліба утворюється 3 види відходів із некондиційного хліба та хліба, строк зберігання якого перевищено: хлібна крихта, хлібна мочка та сухарна крихта. Всі види відходів перевіряються на відсутність бактеріального, пліснявого та іншого забруднення. Хлібна крихта – це подрібнений хліб, хлібна мочка – це подрібнений хліб, розмочений у воді, а сухарна крихта – це подрібнений та висушений хліб. Із перерахованих відходів лише сухарна крихта може зберігатися довгий час, інші відходи псуються за декілька днів через високий вміст вологи та поживних речовин. Частина відходів хліба додається до закваски при приготуванні нового хліба, проте, на заводах рециклізується лише близько 3

% відходів хліба, а утворюється до 5 % відходів від загального виробництва [7]. Зокрема, ПАТ «Київхліб» має 9 хлібокомбінатів у м. Києві та області і щодня продукує 750 т хліба та хлібобулочних виробів [8]. При цьому, об'єми сухарної крихти лише на одному Хлібокомбінаті №12 (м. Київ) досягають 7 т на місяць.

Для порівняння із скринінгом на сухарній крихті суміші хлібів із пшеничного та житнього борошна проводили скринінг на сухарних крихтах окремих видів хліба: «Хліба українського столичного», «Хліба білоруського» та «Батона нарізного київського» ПАТ «Київхліб» (м.Київ). Сухарну крихту з цих хлібів отримували таким чином: після закінчення терміну реалізації відповідних хлібів їх подрібнювали та висушували при температурі  $(60 \pm 5) ^\circ\text{C}$ . Нижче наведена інформація від виробника про склад перерахованих товарних продуктів [8].

При виготовленні «Хліба українського столичного» [9] використовується така сировина: борошно житнє обдирне хлібопекарське, вода питна, борошно пшеничне другого сорту, олія соняшникова, сіль кухонна, дріжджі хлібопекарські. Поживна цінність «Хліба українського столичного» на 100 г продукту складає: білки – 7,0 г, жири – 2,6 г, вуглеводи – 43,2 г; вітаміни:  $B_1$  – 0,25 мг,  $B_2$  – 0,08 мг, РР – 1,72 мг.

При виготовленні «Хліба білоруського» [9] використовується така сировина: борошно житнє сіяне хлібопекарське, вода питна, борошно пшеничне I сорту, пюре картопляне сухе, солод житній сухий ферментований, солод житній сухий неферментований, сироп інвертний (цукор білий кристалічний, вода питна, лимонна кислота, натрій гідрокарбонат), сіль кухонна, дріжджі хлібопекарські, висівки харчові пшеничні, кмин. Поживна цінність «Хліба білоруського» на 100 г продукту складає: білки – 6,3 г, жири – 1,2 г, вуглеводи – 47,5 г; вітаміни:  $B_1$  – 0,15 мг,  $B_2$  – 0,04 мг, РР – 1,33 мг.



При виготовленні «Батона нарізного київського» [10] використовується така сировина: борошно пшеничне вищого сорту, вода питна, олія соняшникова, цукор білий кристалічний, дріжджі хлібопекарські, сіль кухонна. Поживна цінність «Батона нарізного київського» на 100 г продукту складає: білки – 7,6 г, жири – 2,3 г, вуглеводи – 53,8 г; вітаміни:  $B_1$  – 0,13 мг,  $B_2$  – 0,04 мг, РР – 0,99 мг.

Всі дослід з культивування макроміцетів та визначення хімічного складу субстратів проводили на одній партії кожного з відходів виробництва підприємств. Для проведення скринінгу за накопиченням біомаси при культивуванні міцелію макроміцетів концентрація субстратів становила 25 г/дм<sup>3</sup>. Досліди з поверхневого культивування міцелію проводили у конічних колбах об'ємом 0,1 дм<sup>3</sup> із 0,4 дм<sup>3</sup> живильного середовища. Живильні середовища на основі цілих та мелених відходів III-ої категорії та аспіраційних відходів ячменю стерилізували в автоклаві двічі, а на основі сухарної крихти, післяспиртової барди кукурудзи та багаси сорго – один раз 40 хв. при 1 атм. Як інокулом були використані 7-добові культури, вирощені на чашках Петрі з ГПДА (г/дм<sup>3</sup>): глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дріжджовий екстракт – 2,0;  $KH_2PO_4$  – 1,0;  $K_2HPO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  – 0,25; агар-агар – 20,0 г, дистильована вода – 1 дм<sup>3</sup>. Три диски міцелію діаметром 5 мм вирізали стерильною трубкою по краю активно ростучої колонії та інокулювали колби з живильними середовищами. Інокульовані колби з живильними середовищами інкубували у термостаті при температурі  $26 \pm 2$  °C протягом 14 діб.

### 2.2.2. Глибинне культивування

В умовах глибинної культури досліджували ріст видів, що були відібрані за ознакою найбільшої біомаси при стаціонарному культивуванні на відходах перероблення зернових культур.

Досліди проводили у конічних колбах об'ємом  $0,25 \text{ дм}^3$  із  $0,05 \text{ дм}^3$  живильного середовища. Живильне середовище з сухарною крихтою з суміші хлібів із пшеничного та житнього борошна стерилізували одноразово в автоклаві 40 хв при 1 атм.

Інокулюм вносили в кількості 10 % (об'ємних), концентрація інокулюму становила  $1,5 \pm 0,5 \text{ г/дм}^3$ . Як посівний матеріал використовували міцелій в експоненційній фазі росту, культивований в таких же умовах, як і в умовах експерименту. Для отримання посівного міцелію використовували гомогенізований міцелій, що вирощувався на чашках Петрі з середовищем ГПДА. Колби інкубували при  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  на качалці при 120 об./хв.

З метою підбору оптимальної за ефективністю біоконверсії субстрату концентрації сухарної крихти використовували такі концентрації,  $\text{г/дм}^3$ : 25, 30, 40, 50, 60 та 70. Культивування проводили протягом семи діб. Для дослідження динаміки накопичення біомаси та рН культуральної рідини застосовували підібрану для кожного виду концентрацію сухарної крихти:  $40 \text{ г/дм}^3$  для *G. lucidum* IBK 1900,  $50 \text{ г/дм}^3$  для *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353, а також  $60 \text{ г/дм}^3$  для *S. commune* IBK 1768.

### **2.3. Визначення фізико-хімічних показників біомаси макроміцетів, культуральної рідини та субстратів**

Міцелій відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Концентрація біомаси визначалася ваговим методом [11]. Вологість субстратів та цільового продукту (міцелію висушеного при  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) визначали висушуванням наважки 5 г при температурі  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  у сушильній шафі до постійної маси [12]. Зольність міцеліальної маси грибів та субстратів визначали шляхом спалювання наважки 2 г у муфельній печі при температурі

600-900°C до повного озолення із наступним визначенням кількості неспаленого залишка [13].

Вміст загального Нітрогену у відходах перероблення зернових культур та біомасі визначали за методом К'ельдаля [14] з модифікаціями. Для озолення зразків, переганяння та титрування за методом К'ельдаля використовуються різні підходи [15]. Для озолення 0,5 г подрібнених зразків використовували каталізатори [14]: 0,5 г  $K_2SO_4$  та 0,125 г  $CuO$  при нагріванні у мінералізаторі. Вміст Нітрогену (%) визначали титруванням 0,1н розчином  $NaOH$  нейтралізованого 0,1н  $HCl$  після перегоняння амоніаку [15]. Сирий протеїн розраховували перерахунком кількості загального Нітрогену з використанням коефіцієнту 4,38 для біомаси грибів [16] та 5,7 – для субстратів [17].

Вміст сирого жиру досліджували екстрагуванням петролейним ефіром (для біомаси грибів) [18] та гексаном (для субстратів) у апараті Сокслет [19]. Вміст вуглеводів (%) розраховували за формулою [18]:

$$100 \% - (\text{вологість} + \text{зольність} + \text{сирий жир} + \text{сирий протеїн}).$$

Енергетичну цінність оцінювали згідно співвідношення: білок – 4,0 кКал, жири – 8,37 кКал та вуглеводи – 3,48 кКал [16].

Вміст ендopolісахаридів у біомасі макроміцетів визначали ваговим методом [20]. рН культуральної рідини визначали потенціометричним методом. У культуральній рідині визначали концентрацію органічних кислот [21] та редукувальних речовин [22].

*Визначення жирнокислотного профілю сирого жиру міцелію грибів та субстрату.* Препарат поміщали в скляну ампулу та додавали 1,0 мл 2 N розчину хлористого ацетилу, в попередньо охолодженому метанолі. Суміш витримували при 80 °C впродовж 4 год. Метиллові ефіри жирних кислот екстрагували гексаном. Фракцію н-гексану вводили в хроматограф. Аналіз

метилових ефірів жирних кислот проводили за методикою [23] на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert (Agilent technologies, США). Колонка капілярна HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм. Температурний режим 150-250 °С, градієнт температури 4 °С/хв, газ-носії гелій, швидкість потоку через колонку 1,0 мл/хв. Температура випаровувача 250 °С, з поділом потоку 1:100. Режим іонізації – електронний удар з енергією в 70 eV, хроматограму отримували в режимі SCAN в діапазоні 40-700 m/z. Ідентифікацію компонентів досліджуваних проб проводили з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02 та стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот (Supelco, США).

Ступінь ненасиченості ліпідів (CH, %) визначали за формулою [24]:

$$CH = \frac{1(\% \text{ моноєни}) + 2(\% \text{ дієни}) + 3(\% \text{ триєни})}{100}.$$

*Визначення амінокислотного складу міцелію грибів та субстрату.* Амінокислотний профіль (у %) та вміст амінокислот у білках біомаси та субстрату досліджували на амінокислотному аналізаторі (“Mikrotechna”, Чехія) [25, 26]. Хімічний критерій амінокислот (скор) розраховували як співвідношення граму лімітувальної амінокислоти в білку досліджуваного зразку до такої ж кількості відповідної амінокислоти в еталонному білку, помножене на 100 [27]. Індекс незамінних амінокислот (EAA – Essential Amino Acid Index) визначали як відношення вмісту незамінних амінокислот зразку до вмісту незамінних амінокислот в ідеальному білку у відсотках [28]. Прогнозована біологічна цінність (BV, %) розраховувалась за формулою [28]:

$$BV = 1,09 \times EAA - 11,7.$$

Індекс поживності (NI, %) визначали за формулою [28]:

$$NI = \frac{EAA \times \text{Білок}(\%)}{100}.$$

*Визначення вмісту вітамінів у міцелію грибів та в субстраті.* Визначення вітаміну В<sub>1</sub> (тіаміну) базувалося на окисненні тіаміну до тіохрому, екстрагуванні тіохрому в органічний розчинник та вимірюванні флюоресценції [29]. Вміст вітаміну В<sub>2</sub> (рибофлавіну) досліджувався з використанням рибофлавін зв'язувального апопротеїну з курячих яєць [30]. Оцінювання вмісту вітаміну В<sub>3</sub> (РР, ніацину) базувалося на гідролізі, кількісному отриманні забарвленого похідного глютаконового альдегіду та подальшого колориметричного визначення [31]. Вміст вітаміну В<sub>9</sub> (фолатів) аналізувався за зміною інтенсивності флюоресценції до та після окиснення фолатів, попередньо очищених від інтерферувальних компонентів [32].

#### **2.4. Біотехнологічні параметри процесу культивування макроміцетів на живильних середовищах із продуктами перероблення зернових культур**

Для визначення швидкості росту міцелію макроміцетів (продуценту) (X, г/дм<sup>3</sup>×добу) використовували формулу [24]:

$$X = \frac{M_n - M_{n-1}}{t_n - t_{n-1}},$$

де M<sub>n</sub> та M<sub>n-1</sub> – вихід біомаси продуценту (г/дм<sup>3</sup>) в моменти часу t<sub>n</sub> і t<sub>n-1</sub> відповідно.

Швидкість утворення сирого протеїну та ендopolісахаридів у біомасі ( $Y$ , г/дм<sup>3</sup>×добу), а також продуктивність процесу біосинтезу цих метаболітів ( $\Pi$ , мг/г×добу) визначали за формулами [24]:

$$Y = \frac{M'_n - M'_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}; \Pi = \frac{M'_n}{M_n \times \Delta t},$$

де  $M_n$  – вихід біомаси продуценту (г/дм<sup>3</sup>);

$M'_n$  та  $M'_{n-1}$  – вихід білків або ендopolісахаридів (г/дм<sup>3</sup>) в моменти часу  $t_n$  і  $t_{n-1}$  відповідно.

Ефективність біоконверсії відходів перероблення зернових культур ( $E$ , %) [33] розраховували за формулою:

$$E = \frac{M_n}{M_w} \times 100\%,$$

де  $M_n$  – суха маса міцелію;

$M_w$  – суха маса субстрату.

## **2.5. Визначення гемаглютинувальної та антимікробної активності міцелію макроміцетів і субстрату**

Для визначення гемаглютинувальної активності готували лектиновмісну витяжку. До 1 г сухого міцелію (або сухарної крихти) додавали 0,01 дм<sup>3</sup> 0,9 % NaCl, перемішували 2 години, центрифугували при 6000 об./хв та фільтрували. 0,01 дм<sup>3</sup> лектиновмісної витяжки додавали у співвідношенні 1:1 до крові людини чотирьох груп, перемішували та давали відстоятися 1 годину в капілярах Панченкова, після чого вимірювали ступень осадження еритроцитів (мм) у порівнянні з контролем (кров без додавання екстракту) [24].

Для визначення антимікробної активності отримували екстракт міцелію макроміцетів або сухарної крихти. До 5 г сухого міцелію або сухарної крихти додавали 0,1 дм<sup>3</sup> дистильованої води та кипятили 3 хв [35].

Дослідження антимікробної активності екстрактів проводили на отриманих із Української колекції мікроорганізмів (УКМ) Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [36] тест-культурах: бактерій *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 УКМ В-906 (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* Hauser, 1885 УКМ В-905 (ATCC 6896), *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter 1872, Migula 1900 УКМ В-900 (ATCC 9027) та дріжджів *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 УКМ Y-1918 (ATCC 885-653).

Культури мікроорганізмів пересівали на чашки Петрі з агаризованими живильними середовищами. Для культивування *C. albicans* застосовували середовище Сабуро (склад, г/дм<sup>3</sup> води: 40 глюкоза, 10 пептон, 20 агар-агар). Для вирощування бактерій використовували м'ясо-пептонне живильне середовище. Приготування м'ясо-пептонного живильного середовища починається з м'ясного відвару: 1 кг подрібненого м'яса заливається 2 л дистильованої води, екстрагується 24 год, кип'ятиться протягом 2 год, фільтрується, доливається дистильованою водою до початкового об'єму. До м'ясного відвару вносять інші компоненти живильного середовища, г/дм<sup>3</sup>: 10 пептон, 5 NaCl, 20 агар-агар.

Дані мікроорганізми є тестовими штамами для визначення антимікробної дії лікарських засобів [36]. Визначення антимікробної активності екстрактів стосовно тест-культур проводили згідно методики для визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів за допомогою паперових дисків [37]. Як негативний контроль для визначення антимікробної дії екстрактів міцелію використовували екстракт сухарної крихти. Як позитивний контроль антимікробної дії застосовували стерильні паперові диски зі стандартними для певної культури антибіотиками [38]:

ампіцилін (10 мкг) для *P. vulgaris* та для *E. coli*, гентаміцин (10 мкг) для *P. aeruginosa* та кетоконазол (50 мкг) для *C. albicans*.

## 2.6. Статистична обробка експериментальних даних

Кількісні результати, що були отримані у проведених експериментах, оброблено статистичними методами аналізу [39] та виконано розрахунки середнього арифметичного та довірчих інтервалів за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2010 (Сполучені Штати Америки). Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно *t*-критерієм Стюдента при 5 %-му рівні значущості у програмі OriginPro 8.5.1 (Сполучені Штати Америки). Побудову графіків та діаграм проводили за використання програми OriginPro 8.5.1. Фотографії були зроблені цифровою фотокамерою Panasonic DMC-FZ7 (Японія).



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бухало А. С. Каталог колекції культур шапинкових грибів (ІВК) / А. С. Бухало, Н. Ю. Митропольская, О. Б. Михайлова. – К.: Альтерпрес, 2011. – 100 с.
2. IMA Database. Mycobank. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://mycobank.org/quicksearch.aspx> (дата звернення: 10.05.2017)
3. Класифікатор відходів (ДК 005-96). – [Чинний від 1996-10-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2008. – 281 с. – (Основоположні стандарти).
4. Цыганков С. П. Биоэтанол / С. П. Цыганков. – К.: ООО «НПП «Интерсерис», 2010. – 160 с.
5. Борошно, побічні продукти і відходи. Терміни та визначення (ДСТУ 2209-93). – [Введ. 1994-07-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 1994. – 57 с. – (Стандарти на терміни та визначення).
6. ГОСТ Р 53358-2009. Продукты пивоварения. Термины и определения. – [Введ. 2009-07-07]. – М.: Стандартинформ, 2009. – 8 с. – (Стандарты на термины и определения).
7. UK Patent GB № 2126071 Method and apparatus for making a fermenting dough for the preparation of bread and bakery products using waste bread. 1986-06-25, A2B MB31
8. Київхліб [Електронний ресурс] / Режим доступу : <http://www.kyivhlib.com.ua/> (дата доступу: 02.10.2014)
9. ДСТУ-П 4583:2006. Хліб із житнього та суміші житнього і пшеничного борошна. Загальні технічні умови. – [Введ. 01.07.2007]. – К.: Держспоживстандарт України, 2006. – 12 с.
10. ДСТУ-П 4587:2006. Вироби булочні. Загальні технічні умови. – [Введ. 01.07.2007]. – К.: Держспоживстандарт України, 2006. – 12 с.

11. Методи експериментальної мікології: Довідник / Під ред. В.І. Білай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
12. ГОСТ 29143-91 (ISO 712-85) Зерно и зернопродукты. Определение влажности (рабочий контрольный метод). – [Введ. 1992-10-01]. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. – 7 с. – (Стандарты на методы контролю).
13. ДСТУ ISO 2171:2009 Зернові, бобові та продукти їх помелу. Визначення загальної золи методом озолювання. – [Введ. 2011-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2011. – 11 с. – (Стандарты на методы контролю).
14. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – М: Колос, 1985. – 254 с.
15. ДСТУ ISO 1871:2003 Продукты харчові сільськогосподарські. Загальні настанови щодо визначення вмісту азоту методом К'ельдаля. – [Введ. 2005-01-07]. – К.: Держспоживстандарт України, 2007. – 11 с. – (Стандарты на методы контролю).
16. Mushrooms as functional foods / [ed. by Cheung P.C.K.]. – New York: Wiley, 2008. – 268 p.
17. Нечаев А. П. Пищевая химия / А. П. Нечаев, С. Е. Траубенберг, А. А. Кочеткова. – СПб.: ГИОРД, 2007. – С. 119–120.
18. Liu Y. T. Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity / Y. T. Liu, J. Sun, Z. Y. Luo [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2012. – Vol. 50. – P. 1238–1244.
19. ГОСТ 29033-91. Зерно и продукты его переработки. Метод определения жира. – [Введ. 1992-07-01]. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2004. – 7 с. – (Стандарты на методы контролю).
20. Chihara G. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.

- (an Edible Mushroom) / G. Chihara, J. Hamuro, Y. Y. Maeda [et al.] // *Cancer Res.* 1970. – Vol. 30, Iss. 11. – P. 2776–2781.
21. Методы технологического и биохимического контроля в виноделии / Под ред. Г. Г. Валуйко. – М.: Пищ. пром-ть, 1980. – 144 с.
  22. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии / И. Тодоров. – София: Медицина и физкультура. 1968. – С. 581–583.
  23. Christie W. W. Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide / W. W. Christie. – Bridgwater, Somerset : The Oily Press. – 1989. – 307 p.
  24. Бабицкая В. Г., Щерба В. В., Пучкова Т. А., Бисько Н. А. Биологически активные соединения съедобных и лекарственных грибов (С. 76-344) / Н. А. Бисько, В. Г. Бабицкая, А. С. Бухало [и др.] // Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 2 / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев, 2012. – 459 с.
  25. Крищенко В. П. Методы оценки качества растительной продукции / В. П. Крищенко. – М.: Колос, 1983. – 192 с.
  26. Henderson J. W. Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC / J. W. Henderson, R. D. Ricker, B. A. Bidlingmeyer, C. Woodward // *Agilent Technical Note.* – 1999. – P. 5980–1193E.
  27. Amino acid content of foods and biological data on proteins / FAO. Food policy and food science service. Nutrition division. – 1970. – Series: FAO nutritional studies. – Vol. 24: Food and agriculture organization of the United Nations, Rome. – 200 p.
  28. Crisan E.V., Sands A. Nutritional value / The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms // Ed. by S.T. Chang, W.A. Hayes. – New York: Academic Press, 1978. – P. 137–165.

29. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю.М. Островского. – Минск : Наука и техника, 1979. – 551 с.
30. Коденцова В. М. Выделение рибофлавинсвязывающего апобелка из белка куриных яиц и его использование для определения рибофлавина в биологических образцах / В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская, В. В. Рисник [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30, № 4–5. – С. 603–609.
31. Степанова Е. Н. О колориметрическом методе определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах и биологических объектах / Е. Н. Степанова // Вопросы питания. – 1963. – Т.22, №4. – С. 66–70.
32. Григорьева М. П. Флюорометрический метод определения фолиевой кислоты в пищевых продуктах / М. П. Григорьева, Е. Н. Степанова, Г. А. Сапожникова // Вопросы питания. – 1969. – Т. 28, № 3. – С. 65–69.
33. Wu J.-Zh. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer – Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency / J.-Zh. Wu, P. C.-K. Cheung, K.-H. Wong, N.-L. Huang // Food Chem. – 2003. – Vol. 81, Iss. 3. – P. 389–393.
34. Луцик А. Д. Лектины / А. Д. Луцик, Е. Н. Панасюк, М. Д. Луцик. – Львов: Высшая школа. – 1981. – 156 с.
35. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А. М. Гродзінський. – К.: Українська Енциклопедія, 1992. – 544 с.
36. Украинская коллекция микроорганизмов. Каталог культур / Под ред. В. С. Подгорского, О. И. Коцофляк, Е. А. Киприановой, О. Р. Гвоздяк. – К.: Наукова думка, 2007. – 270 с.
37. Valgas C. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products / C. Valgas, S. M. de Souza, E. F. A. Smania, A. Smania // Braz. J. Microbiol. – 2007. – Vol. 38. – P. 369–380.

38. Katircioglu H. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions / H. Katircioglu, N. Mercan // Afr. J. Biotechnol. – 2006. – Vol. 5. – Iss. 11. – P. 1151–1153.
39. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий // Изд. 3-е, испр. Минск: Высшэйшая школа. – 1973. – 320 с.

## РОЗДІЛ 3

### СКРИНІНГ ВИДІВ ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ВІДХОДАХ ПЕРЕРОБЛЕННЯ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

#### 3.1. Характеристика складу субстратів – продуктів перероблення зернових культур

Завдяки потужним ферментативним системам макроміцети мають здатність розкладати широкий спектр субстратів – відходів переробної промисловості. Для отримання біомаси лікарських грибів нами було обрано відходи перероблення зернових культур (пшениці, жита, ячменю, кукурудзи та сорго), оскільки за літературними даними [1] відомо, що гриби добре утилізують субстрати з зернової сировини, однак, обрані нами рідкі живильні середовища на основі сухарної крихти, відходів пшениці та жита III категорії з млина, аспіраційних відходів ячменю, післяспиртової барди кукурудзи та багаси сорго (рис. 3.1) були використані для культивування лікарських грибів вперше.



Рис. 3.1. Загальний вигляд відходів перероблення зернових культур, що були використані в роботі як субстрати для культивування міцелію лікарських макроміцетів

Результати хімічного аналізу субстратів для культивування лікарських макроміцетів показали (рис. 3.2), що основним компонентом є вуглеводи (57-78 %), за винятком барди кукурудзи, де сирий протеїн і вуглеводи знаходились приблизно на однаковому рівні ( $34,69 \pm 3,50$  % а.с.р. та  $36,39 \pm 4,35$  % а.с.р. відповідно). Вміст сирого жиру, як і сирого протеїну, був найбільшим у барді кукурудзи ( $13,11 \pm 0,50$  % а.с.р.), а в інших субстратах становив близько 1 %. Вологість досліджених відходів перероблення зернових культур коливалась в межах 8-10 % (що могло забезпечити тривале зберігання субстратів), зольність – від 2 % до 10 %.

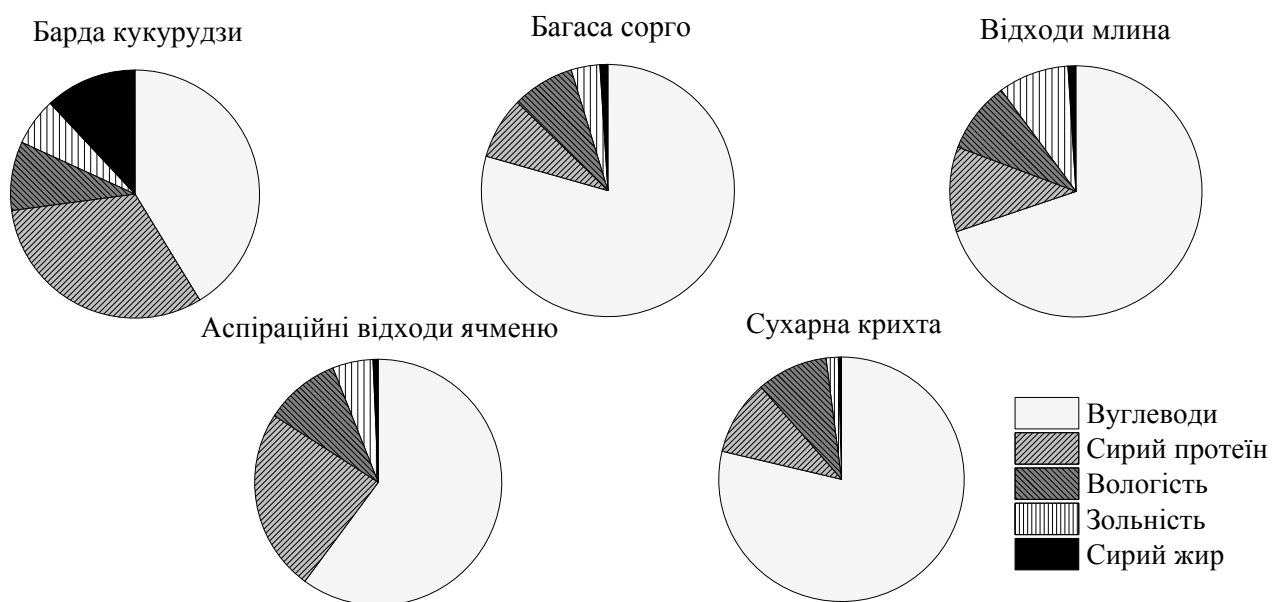


Рис. 3.2. Хімічний склад субстратів, %

Найбільший вміст органічних речовин (сума білків, жирів, вуглеводів) встановлено у сухарній крихті, а мінеральних (зольність) – у відходах III-ої категорії з млина (рис. 3.2). Показник рН живильного середовища на основі барди кукурудзи після автоклавування складав  $4,5 \pm 0,1$ , на основі багаси сорго –  $4,6 \pm 0,1$ , а для інших досліджуваних субстратів –  $6,0 \pm 0,5$ .

### 3.2. Скринінг культур макроміцетів при поверхневому культивуванні на відходах перероблення зернових культур

На післяспиртовій барді кукурудзи досліджені види макроміцетів утворювали від 0,21 г/дм<sup>3</sup> до 2,35 г/дм<sup>3</sup> а.с.р. біомаси (рис. 3.3), цей субстрат виявився таким, що найменше сприяє накопиченню біомаси. На цьому субстраті найкраще росли *G. lucidum* IBK 1900, *O. sinensis* IBK 1928 та *C. militaris* IBK 1862, а ріст *L. edodes* IBK 502 був майже відсутнім.

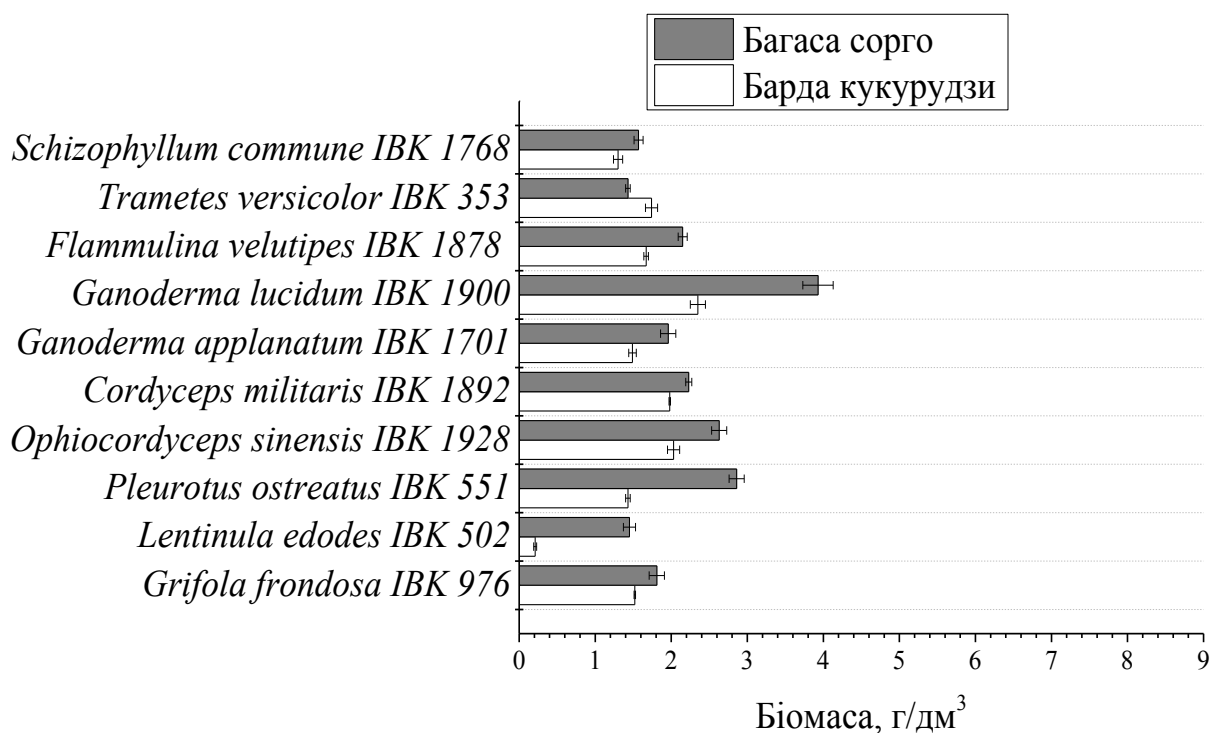


Рис. 3.3. Накопичення біомаси лікарськими макроміцетами на живильних середовищах з післяспиртовою бардою кукурудзи та з багасою сорго у поверхневій культурі (14 доба культивування)

На багасі сорго гриби синтезували від 1,43 г/дм<sup>3</sup> до 3,93 г/дм<sup>3</sup> міцеліальної маси (рис. 3.3). Культивування на багасі сорго призводило до більшого на 11-50 % накопичення біомаси грибів, ніж на барді кукурудзи майже для всіх культур, крім *L. edodes* IBK 502 (збільшення біомаси на багасі



сорго у порівнянні з бардою кукурудзи в 7 разів) та *T. versicolor* IBK 353 (зменшення біомаси на багасі сорго у порівнянні з бардою кукурудзи на 18 %) (рис. 3.3). Найвищі показники біомаси при культивуванні на багасі сорго спостерігалися для *G. lucidum* IBK 1900, *P. ostreatus* IBK 551 та *O. sinensis* IBK 1928, а найнижчі показники біомаси – для *L. edodes* IBK 502 та *T. versicolor* IBK 353.

На відходах із млина III-ої категорії найкраще росли базидієві гриби *G. lucidum* IBK 1900, *P. ostreatus* IBK 551, *G. applanatum* IBK 1701 та *L. edodes* IBK 502 (рис. 3.4). Загалом, досліджувані гриби синтезували від 0,15 г/дм<sup>3</sup> до 4,27 г/дм<sup>3</sup> біомаси (рис. 3.4). Міцелій *S. commune* IBK 1768 та *G. frondosa* IBK 976 не колонізував усю площу поверхні при культивуванні на відходах з млина III-ої категорії, утворюючи найменшу концентрацію біомаси (рис. 3.5).

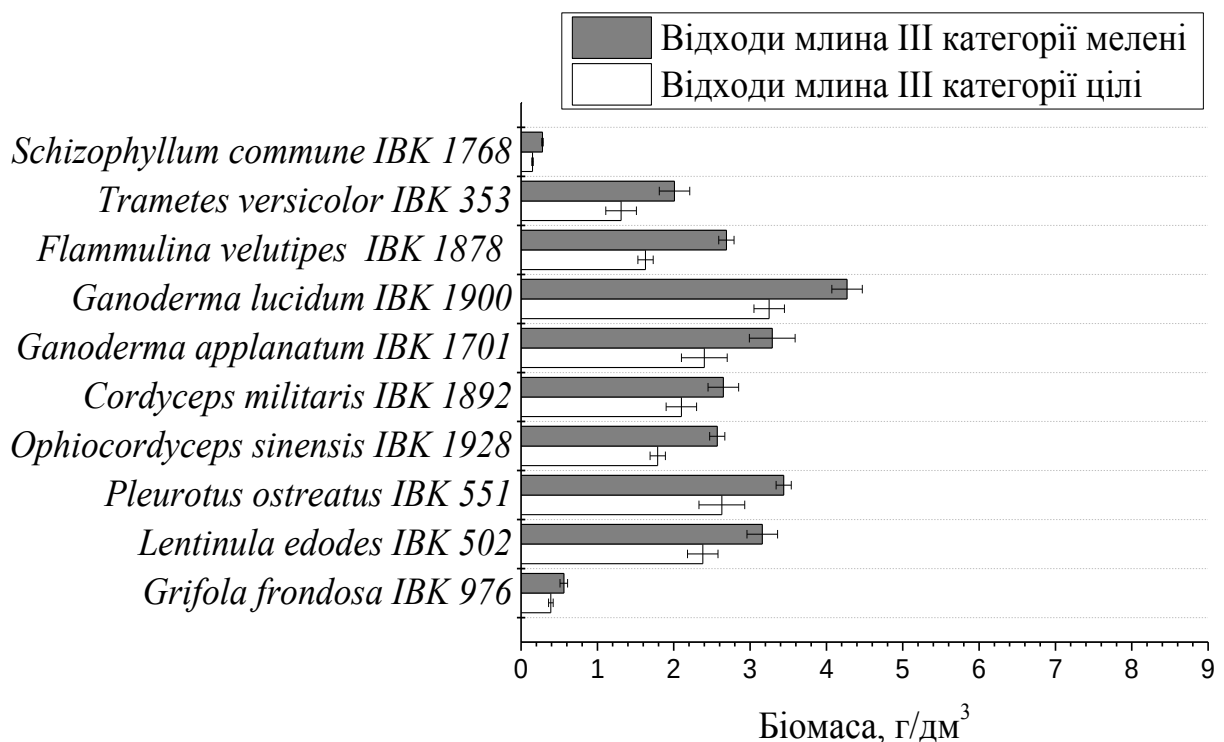


Рис. 3.4. Накопичення біомаси лікарськими макроміцетами на живильних середовищах з відходами млина III-ої категорії різного ступеню подрібнення у поверхневій культурі (14 доба культивування)

На мелених відходах з млина III-ої категорії гриби нарощували біомасу на 19-50 % більше в порівнянні із цілими, що є наслідком збільшення площини поверхні контакту субстрату та кращої екстракції речовин у живильне середовище. Позитивний вплив ступеню подрібненості на ріст грибів було виявлено іншими дослідниками [2].

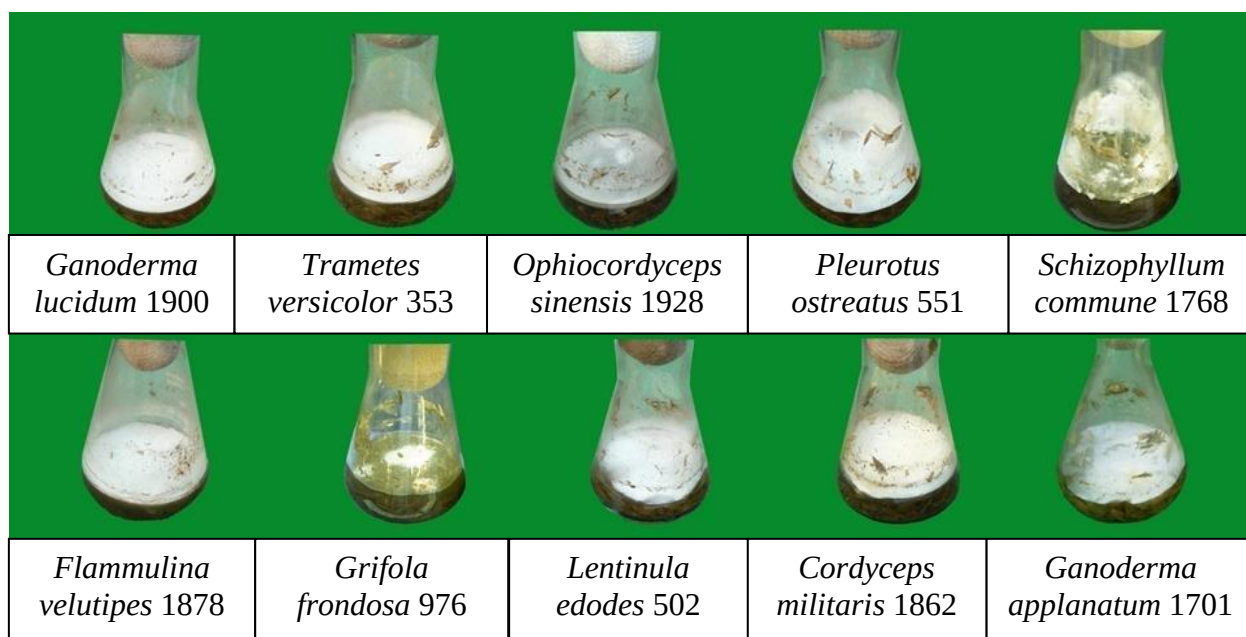


Рис. 3.5. Ріст міцелію макроміцетів на рідкому живильному середовищі з цілими відходами млина III-ої категорії, 14-та доба поверхневого культивування, колби 100 мл (зовнішній вигляд)

На аспіраційних відходах ячменю гриби утворювали від 3,17 г/дм<sup>3</sup> до 6,19 г/дм<sup>3</sup> міцеліальної маси (рис. 3.6). Збільшення виходу міцеліальної маси досліджених видів грибів при культивуванні на аспіраційних відходах ячменю (рис. 3.7) у порівнянні з біомасою, одержаною на відходах III-ої категорії з млина (рис. 3.5), може бути обумовлене збагаченням субстрату частинками дробленого солоду, ендоспермом та борошном ячменю. Як і на відходах млина, на аспіраційних відходах ячменю добре росли гриби роду *Ganoderma* та *P. ostreatus* IBK 551, а також ентомофільний гриб відділу

*Ascomycota* – *O. sinensis* IBK 1928; найменший приріст біомаси спостерігався для *G. frondosa* IBK 976.

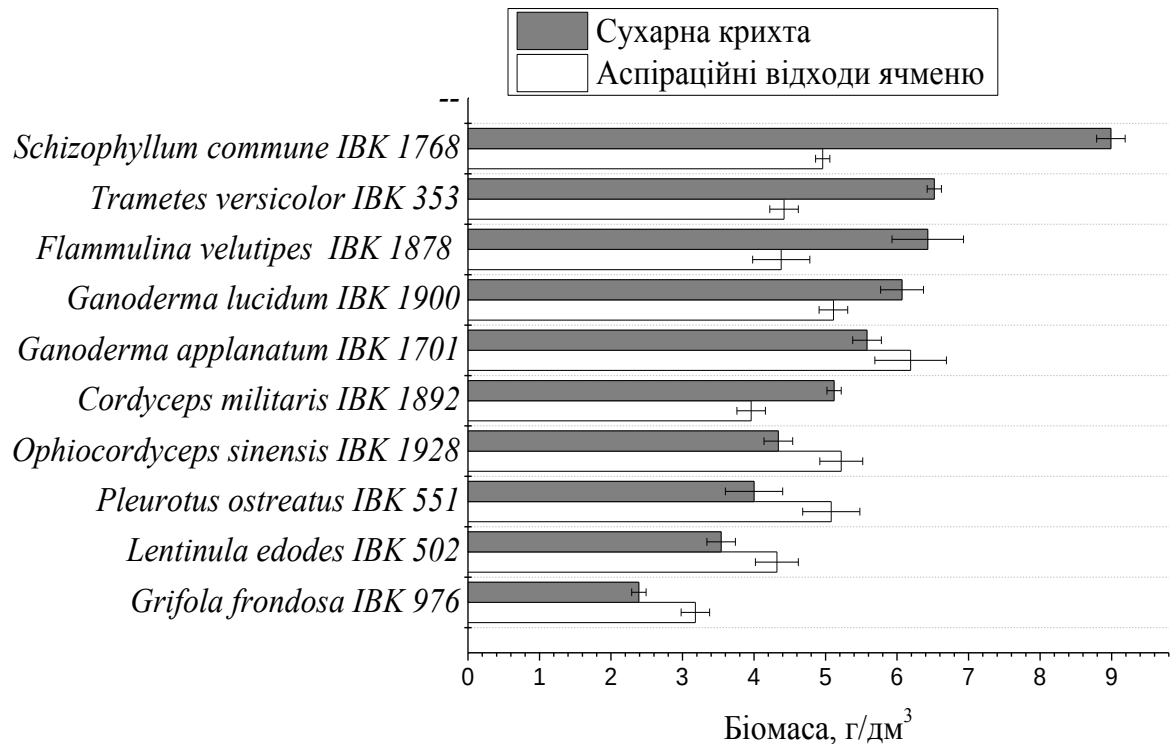


Рис. 3.6. Накопичення біомаси лікарськими макроміцетами на живильних середовищах з аспіраційними відходами ячменю та з сухарною крихтою суміші хлібів із пшеничного та житнього борошна у поверхневій культурі (14 доба культивування)

На сухарній крихті з суміші хлібів із житнього та пшеничного борошна гриби продукували від 2,39 г/дм<sup>3</sup> до 8,99 г/дм<sup>3</sup> біомаси (рис. 3.6). На сухарних крихтах із окремих видів хліба макроміцети утворювали таку концентрацію біомаси: на сухарній крихті з «Батона нарізного київського» – від 1,82 г/дм<sup>3</sup> до 7,15 г/дм<sup>3</sup>; на сухарній крихті з «Хліба українського столичного» – від 2,35 г/дм<sup>3</sup> до 9,07 г/дм<sup>3</sup>; на сухарній крихті з «Хліба білоруського» – від 1,90 г/дм<sup>3</sup> до 8,65 г/дм<sup>3</sup>. Таким чином, максимальна та мінімальна концентрація біомаси макроміцетів суттєво не відрізнялася (в межах 0,6 г/дм<sup>3</sup>) при культивуванні на живильних середовищах з різних видів сухарної крихти. На

всіх видах сухарної крихти добре росли два види роду *Ganoderma* (концентрація біомаси становила від 5,5 до 9,1 г/дм<sup>3</sup>), а найгірше росли *L. edodes* IBK 502 та *G. frondosa* IBK 976. Загалом, при поверхневому культивуванні на сухарній крихті суміші хлібів біомасу більше 5 г/дм<sup>3</sup> накопичували 6 видів, на сухарній крихті «Хліба білоруського» – 5 видів, «Хліба українського столичного» – 4, а «Батона нарізного київського» – лише 2 види.

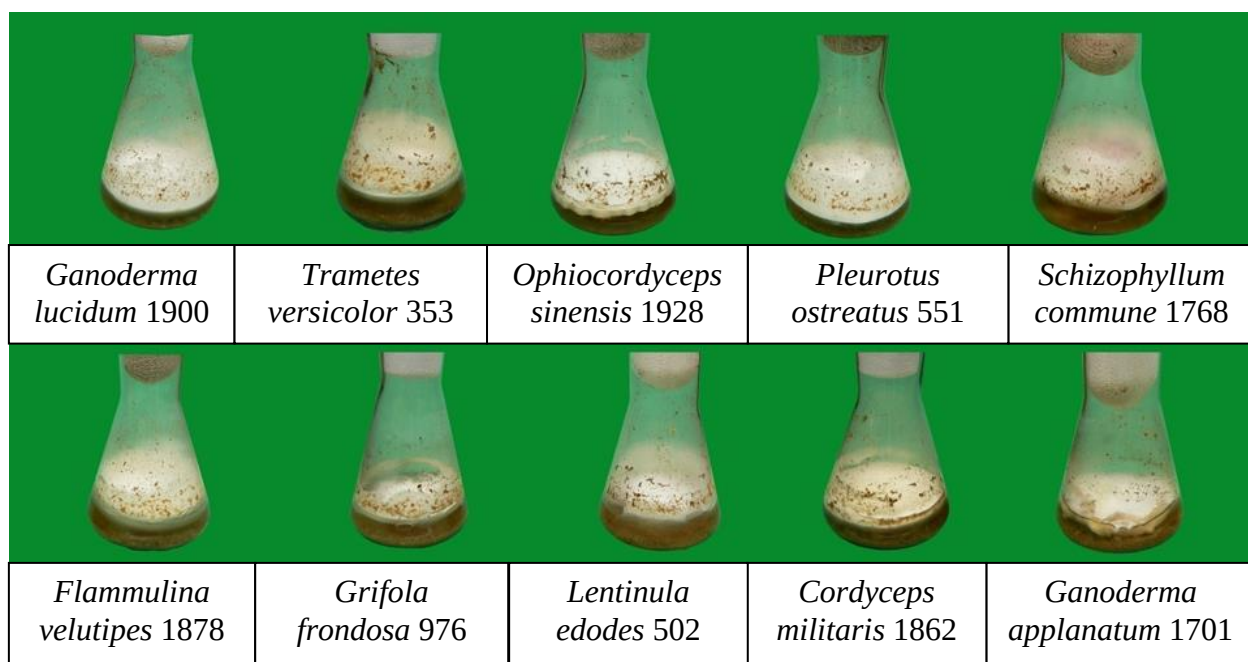


Рис. 3.7. Ріст міцелію макроміцетів на рідкому живильному середовищі з аспіраційними відходами ячменю, 14-та доба поверхневого культивування, колби 100 мл (зовнішній вигляд)

Всі досліджувані види грибів, крім *L. edodes* та *P. ostreatus*, росли статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) краще на сухарній крихті з суміші хлібів із житнього та пшеничного борошна, ніж на відходах із млина III-ої категорії (рис. 3.4-3.6, 3.8). При порівнянні результатів експериментів по культивуванню на сухарній крихті з суміші хлібів із житнього та пшеничного борошна та аспіраційних відходах ячменю виявилось, що половина досліджуваних видів грибів синтезувала більшу кількість біомаси на

аспіраційних відходах ячменю, а інша половина – на сухарній крихті. В той же час, при культивуванні на сухарній крихті був отриманий максимальний показник біомаси – 9 г/дм<sup>3</sup> для *S. commune* IBK 1768 за 14 діб.

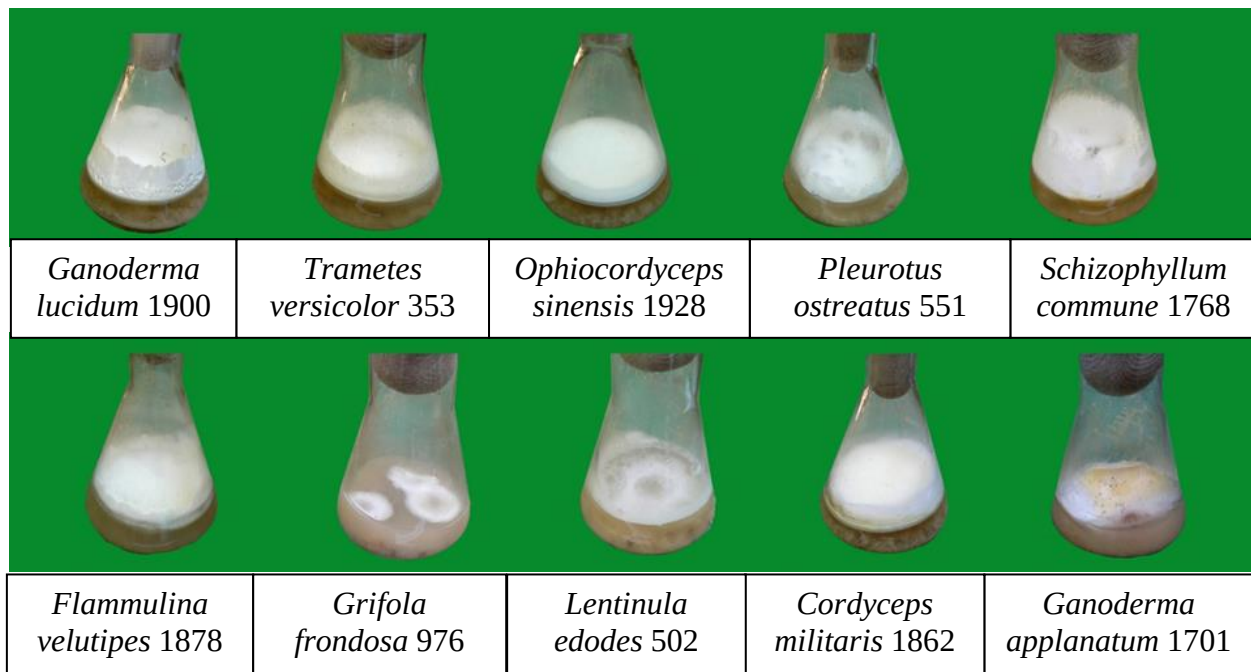


Рис. 3.8. Ріст міцелію макроміцетів на рідкому живильному середовищі з сухарною крихтою, 14-та доба поверхневого культивування, колби 100 мл (зовнішній вигляд)

Слід відзначити високу ефективність біоконверсії цього субстрату *S. commune* IBK 1768 на рівні 39,28 % (табл. 3.1). Високу ефективність біоконверсії сухарної крихти мали також *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900 (28,69 %, 28,25 % й 26,48 % відповідно). Для порівняння, ефективність біоконверсії інших субстратів досліджених штамів грибів становила від 0,44 % до 27,09 % (табл. 3.1).

На післяспиртовій барді кукурудзи, багасі сорго та відходах із млина III-ої категорії найвищу ефективність біоконверсії мав штам *G. lucidum* IBK 1900 (10,33-16,00) %, тобто на (1,41-13,7) % більше, ніж інші види. Якщо порахувати середню ефективність біоконверсії субстратів 10-ма видами грибів при поверхневому культивуванні, то для сухарної крихти вона буде

складати 23,1 %, для аспіраційних відходів ячменю – 20,6 %, для багаси сорго – 9,5 %, для цілих відходів млина III категорії – 7,8 %, а для барди кукурудзи – 6,9%.

Таблиця 3.1

**Ефективність біоконверсії відходів перероблення зернових культур  
міцелієм макроміцетів при поверхневому культивуванні (14 діб), %**

| Види та штами макроміцетів              | Післяспиртова барда кукурудзи | Багаса сорго | Відходи з млина III-ої категорії цілі | Аспіраційні відходи ячменю | Сухарна крихта |
|-----------------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------------------------------|----------------------------|----------------|
| <i>Cordyceps militaris</i> IBK 1862     | 8,70                          | 9,70         | 9,25                                  | 17,32                      | 22,51          |
| <i>Ophiocordyceps sinensis</i> IBK 1928 | 8,92                          | 11,43        | 7,49                                  | 23,09                      | 18,98          |
| <i>Flammulina velutipes</i> IBK 1878    | 7,34                          | 9,35         | 7,05                                  | 19,09                      | 28,25          |
| <i>Ganoderma applanatum</i> IBK 1701    | 6,55                          | 8,52         | 10,13                                 | 27,09                      | 24,28          |
| <i>Ganoderma lucidum</i> IBK 1900       | 10,33                         | 16,00        | 14,09                                 | 22,65                      | 26,48          |
| <i>Grifola frondosa</i> IBK 976         | 6,68                          | 7,87         | 1,32                                  | 13,77                      | 10,15          |
| <i>Lentinula edodes</i> IBK 502         | 0,92                          | 6,30         | 10,13                                 | 19,09                      | 15,45          |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> IBK 551      | 6,28                          | 12,43        | 11,45                                 | 22,20                      | 17,21          |
| <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768   | 5,71                          | 6,83         | 0,44                                  | 21,76                      | 39,28          |
| <i>Trametes versicolor</i> IBK 353      | 7,65                          | 6,22         | 5,73                                  | 19,54                      | 28,69          |

Отже, досліджувані види лікарських грибів по-різному засвоювали обрані субстрати. *G. lucidum* IBK 1900 у порівнянні з іншими видами добре росло на досліджених субстратах (на трьох із п'яти було отримано максимальні показники біомаси), накопичуючи біомасу при поверхневому

культивуванні 2,35-6,07 г/дм<sup>3</sup> при концентрації субстратів 25 г/дм<sup>3</sup>. Наприклад, якщо в порядку зменшення біомаси на кожному субстраті макроміцетам нараховувати від 10 до 1 бала, то найбільше балів на сумі п'яти субстратів набере *G. lucidum* IBK 1900 (45 балів із 50 максимальних), далі в порядку зменшення: *O. sinensis* IBK 1928 (35 балів), *G. applanatum* IBK 1701 (32,5 бала), *P. ostreatus* IBK 551 (31 бал), *C. militaris* IBK 1862 (28 балів), *F. velutipes* IBK 1878 (27,5 балів), *T. versicolor* IBK 353 (25 балів), *S. commune* IBK 1768 (22 бала), *L. edodes* IBK 502 (16 балів) та *G. frondosa* IBK 976 (13 балів).

Таким чином, за результатами скринінгу лікарських макроміцетів при культивуванні на відходах перероблення зернових культур можна відібрати групу видів та штамів, які добре ростуть на більшості субстратів. Це *G. lucidum* IBK 1900, *G. applanatum* IBK 1701, *O. sinensis* IBK 1928, *C. militaris* IBK 1862, а також *P. ostreatus* IBK 551.

Цікаво, що у 2007 році на основі даних генетичного аналізу [3] вид *Cordyceps sinensis*, що належав до родини *Clavicipitaceae* перейменували на *Ophiocordyceps sinensis* та віднесли до родини *Ophiocordycipitaceae*. Таким чином, якщо раніше види *C. sinensis* та *C. militaris* належали до одного роду, то тепер класифікація цих видів відрізняється навіть на рівні родини (табл. 2.2). Водночас, як показують результати накопичення біомаси при поверхневому культивуванні на субстратах відходах перероблення зернових культур, *O. sinensis* IBK 1928 та *C. militaris* IBK 1862 виявляли більш подібні закономірності накопичення біомаси, ніж види роду *Ganoderma* (*G. lucidum* IBK 1900 та *G. applanatum* IBK 1701).

Так, біомаса *O. sinensis* IBK 1928 та *C. militaris* IBK 1862 відрізнялась на 2-24 % в залежності від субстрату, а *G. lucidum* IBK 1900 та *G. applanatum* IBK 1701 – на 8-50 % (рис. 3.2-3.4). При цьому, штам *G. applanatum* IBK 1701 ріс краще за *G. lucidum* IBK 1900 лише на аспіраційних відходах ячменю, на інших відходах більшу біомасу накопичував штам *G. lucidum* IBK 1900.

*O. sinensis* IBK 1928 та *C. militaris* IBK 1862 росли майже однаково на барді кукурудзи і мелених відходах млина III категорії, *O. sinensis* IBK 1928 краще росла на багасі сорго та аспіраційних відходах ячменю, а *C. militaris* IBK 1862 – на цілих відходах млина III-ої категорії та сухарній крихті.

У результаті дослідження росту цих же штамів із родів *Ganoderma*, *Ophiocordyceps* та *Cordyceps* на відходах масло-жирового виробництва [4] також виявилось, що *O. sinensis* IBK 1928 та *C. militaris* IBK 1862 накопичують майже однакову біомасу на одних і тих же субстратах, на відміну від *G. lucidum* IBK 1900 та *G. applanatum* IBK 1701 (де накопичення біомаси носило видоспецифічний характер). Однак, якщо в нашому дослідженні *G. lucidum* IBK 1900 росло краще за *G. applanatum* IBK 1701 на 4-ох субстратах відходах перероблення зернових культур із 5-ти, то в дослідженні інших авторів [4], навпаки, *G. applanatum* IBK 1701 краще росло в порівнянні з *G. lucidum* IBK 1900 на 8 субстратах – відходах масло-жирового виробництва із 12.

Найгірше росли на відходах перероблення зернових культур *L. edodes* IBK 502 та *G. frondosa* IBK 976. Слід відмітити, що *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 накопичували максимальну біомасу серед усіх досліджених макроміцетів на всіх субстратах при культивуванні на сухарній крихті, проте на інших досліджених нами субстратах відходах перероблення зернових культур вони не відрізнялися високими показниками біомаси. При цьому, за даними літератури [5] *S. commune* IBK 1768 накопичувало найбільшу біомасу серед 17 видів макроміцетів на інших субстратах відходах перероблення зернових культур – на битій вермішелі, відході борошномельного виробництва (крупка) та на шроті амаранту (*Amaranthus caudatus* L.) після вуглекислотної екстракції.

За результатами досліджень для *G. applanatum* IBK 1701, *O. sinensis* IBK 1928, *P. ostreatus* IBK 551, *L. edodes* IBK 502, *G. frondosa* IBK 976 найкращим субстратом для накопичення біомаси виявилися аспіраційні



відходи ячменю, а для *G. lucidum* IBK 1900, *C. militaris* IBK 1862, *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878 – сухарна крихта (рис. 3.3-3.8). На мелених відходах з млина III-ої категорії досліджені штами грибів нарощували біомасу на 19-50 % більше в порівнянні із цілими. Барда кукурудзи найменше сприяла накопиченню біомаси майже всіх видів грибів, крім *T. versicolor* IBK 353 та *G. frondosa* IBK 976.

Показник рН 3-ох досліджуваних субстратів (крім барди кукурудзи та багаси сорго) був приблизно однаковим та таким, що є оптимальним для росту міцелію більшості видів грибів [6]. Низьке значення рН барди кукурудзи та багаси сорго (4,5-4,6), можливо, негативно вплинуло на накопичення біомаси грибами. Схожий висновок роблять дослідники [4] при аналізі результатів скринінгу макроміцетів при поверхневому культивуванні на відходах масло-жирового виробництва, коли живильне середовище на основі субстрату із макухи плодів шипшини із подібним рН (4,0) призвело до низького накопичення біомаси в порівнянні з іншими субстратами. На доступність живильних речовин при розкладанні субстратів, імовірно, впливав ступінь розчинності субстрату в воді, яку додавали для поверхневого культивування грибів. Зокрема, після автоклавування сухарної крихти субстрат ставав м'яким, без твердих частинок. Навпаки, навіть підвищена температура при автоклавуванні не сприяла розм'якшенню відходів із млина III-ої категорії, основною частиною яких є лузга пшениці та жита. Цей фактор може мати суттєве значення, особливо при поверхневому культивуванні на рідкому середовищі, оскільки найбільш доступними для міцелію є екстраговані у воді речовини.

Враховуючи дані проведеного скринінгу, для подальших досліджень були відібрані штами видів *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900, які накопичували найбільшу біомасу на сухарній крихті.

### 3.3. Підбір концентрації сухарної крихти у живильному середовищі при глибинному культивуванні міцелію відібраних видів лікарських грибів

Було встановлено, що ефективність біоконверсії субстрату залежить від концентрації сухарної крихти в живильному середовищі та біологічних особливостей видів макроміцетів (рис. 3.9). Максимальну ефективність біоконверсії субстрату було виявлено для *G. lucidum* IBK 1900 при концентрації сухарної крихти 40 г/дм<sup>3</sup>, для *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353 – 50 г/дм<sup>3</sup>, для *S. commune* IBK 1768 – 60 г/дм<sup>3</sup>.

При глибинному культивуванні міцелію зазначених видів грибів концентрації субстрату вище 60 г/дм<sup>3</sup> у живильному середовищі були виключені через те, що при більших концентраціях спостерігалось поверхнєве обростання субстрату.

Глибинний спосіб вирощування відібраних видів лікарських грибів дозволив вдвічі скоротити час культивування. При цьому, ефективність біоконверсії субстрату практично не змінилась за тих же концентрацій субстрату (табл. 3.1, рис. 3.9). При оптимізованих концентраціях субстрату концентрація біомаси при глибинному культивуванні збільшилася в 1,7-2,5 рази. Після досягнення максимальних показників біоконверсії субстрату концентрація біомаси продовжувала зростати, проте субстрати утилізувалися вже не так ефективно, із 100 г сухої маси субстрату утворювалось на 1-3 г менше сухої біомаси, ніж при оптимальних значеннях, що свідчить про пригнічення процесів метаболізму при підвищенні концентрації субстрату.

Ефективність біоконверсії при культивуванні на сухарній крихті *T. versicolor* IBK 353 (32-33 %) була близькою до значень, отриманих іншими дослідниками [7] при культивуванні на молочній сироватці (39 %) та пивному суслі (36 %). Ефективність біоконверсії сухарної крихти при глибинному культивуванні *S. commune* IBK 1768 (35-37 %) була вище, ніж

при глибинному культивуванні *S. commune* на детоксифікованому гідролізаті рисової лузги (24 %) [8].

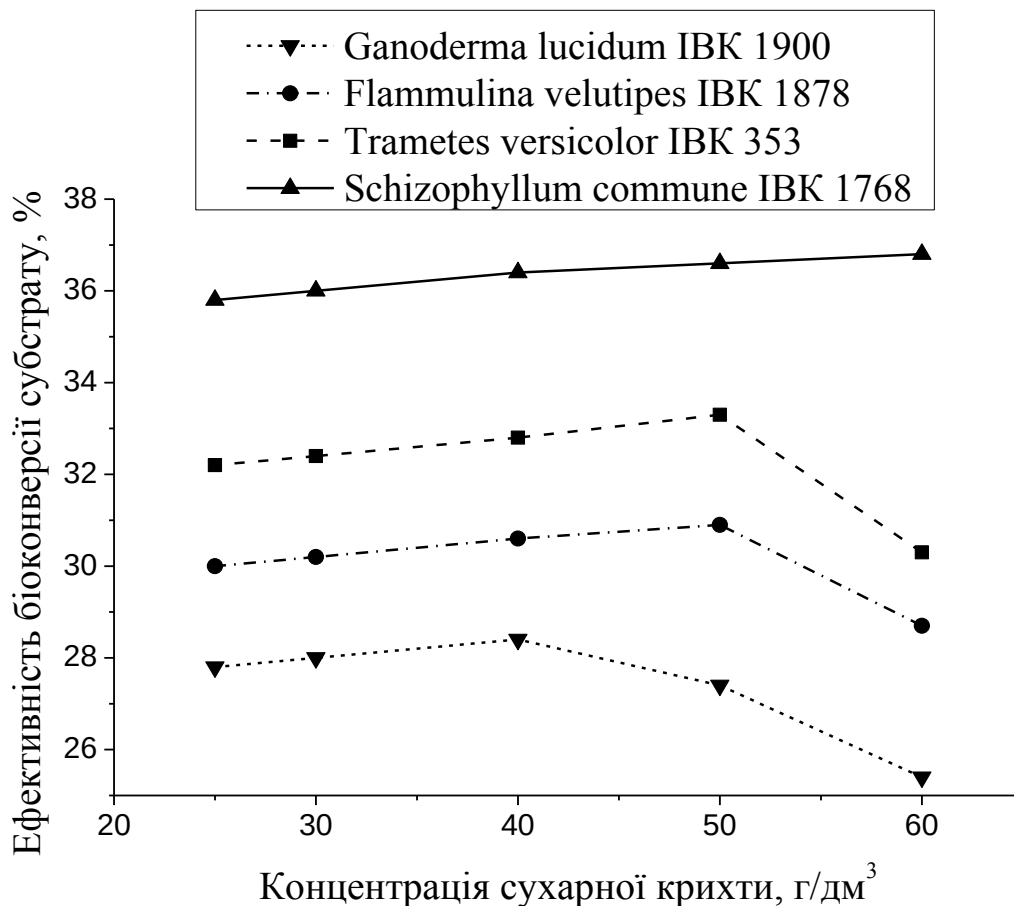


Рис. 3.9. Вплив концентрації сахарної крихти на ефективність біоконверсії субстрату при глибинному культивуванні лікарських макроміцетів протягом 7-ми діб

Таким чином, в результаті скринінгу 10-ти видів лікарських макроміцетів на 5-ти субстратах відходах перероблення зернових культур при поверхневому культивуванні виявлено, що *O. sinensis* 1928, *G. applanatum* IBK 1701, *G. frondosa* IBK 976, *L. edodes* IBK 502 та *P. ostreatus* IBK 551 накопичують найбільшу біомасу на аспіраційних відходах ячменю (від 3,17 г/дм<sup>3</sup> до 6,19 г/дм<sup>3</sup>), а *C. militaris* IBK 1862, *G. lucidum* IBK 1900,

*F. velutipes* IBK 1878, *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 – на сухарній крихті (від 5,12 г/дм<sup>3</sup> до 8,99 г/дм<sup>3</sup>).

Ефективність біоконверсії субстратів та накопичення біомаси макроміцетами при поверхневому культивуванні на рідких живильних середовищах із відходами перероблення зернових культур, за результатами досліджень, залежать від виду грибів, хімічного складу субстратів та ступеня їх подрібнення. Результати експериментальних даних дають можливість припустити, що на ефективність біоконверсії субстратів і на накопичення біомаси грибами мають вплив також доступність та/або розчинність окремих компонентів і рН живильних середовищ для культивування.

Субстрат сухарна крихта був обраний для подальшого дослідження, оскільки при поверхневому культивуванні макроміцетів забезпечував найвищі показники біомаси (до 8,99 г/дм<sup>3</sup>) та ефективності біоконверсії субстрату (до 39,28 %), а також запатентований як компонент живильного середовища для культивування грибів [9].

Глибинний спосіб вирощування міцелію відібраних видів грибів дозволив вдвічі скоротити час культивування в порівнянні з поверхневим. Відповідно до показників максимальної ефективності біоконверсії субстрату, при глибинному культивуванні оптимальна концентрація сухарної крихти становила 40 г/дм<sup>3</sup> для *G. lucidum* IBK 1900, 50 г/дм<sup>3</sup> для *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353, а також 60 г/дм<sup>3</sup> – для *S. commune* IBK 1768.

Основні наукові результати розділу опубліковані у працях: [9–18].

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Poppe J. Use of agricultural waste materials in the cultivation of mushrooms / J. Poppe // Science and Cultivation of Edible Fungi: Proceedings of the 15th International Congress [ed. by L. Van Griensven], 15-19 May, 2000. – Maasticht, Netherlands. – Rotterdam: Balkema, 2000. – P. 3–23.
2. Бабицкая В. Г. Трансформация костры льна в белок мицелиальными грибами / В. Г. Бабицкая, И. В. Стахеев, В. В. Щерба [и др.] // Микология и фитопатология. – 1986. – № 2. – С. 113–119.
3. Sung G.-H. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi / G.-H. Sung, N. L. Hywel-Jones, J.-M. Sung [et al.] // Stud. Mycol. – 2007. – Vol. 57. – P. 5–59.
4. Krupodorova T. A. Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation / T. A. Krupodorova, V. Yu. Barchteyn // J. BioSci. Biotechnol. – 2015. – Vol. 4, Iss. 3. – P. 339–347.
5. Круподьорова Т. А. Альтернативні субстрати для культивування лікарських та їстівних грибів / Т. А. Круподьорова, В. Ю. Барштейн // Мікробіологія і біотехнологія. – Т. 17, № 1. – 2012. – С. 47–56.
6. Elisashvili V. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocess and Products (Review) / V. Elisashvili // Int. J. Med. Mushrooms. – 2012. – Vol. 14, Iss. 3. – P. 211-239. или 14.
7. Клечак І. Р. Особливості росту *Coriolus versicolor* у глибинній культурі / І. Р. Клечак, Н. Ю. Митропольська, Л. О. Антоненко, О. І. Нишпорська // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2009. – Т. 20, № 1. – С. 130–133.
8. Shu Ch. H. Production of schizophyllan glucan by *Schizophyllum commune* ATCC 38548 from detoxificated hydrolysate of rice hull / Ch. H. Shu, H. J. Hsu // J. Taiwan Inst. Chem. E. – 2011. – Vol. 42. – P. 387–393.
9. Іванова Т.С., Бісько Н.А., Циганков С.П., Новак А.Г. Поживне середовище для культивування грибів // Патент України на корисну

модель № 98224. Заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Бюл. № 8 від 27.04.2015р., заявка u 2014 10934, МПК А01G 1/04 (2006. 01).

10. Іванова Т. С. Скринінг лікарських грибів при культивуванні на відходах харчової промисловості України / Т. С. Іванова, Т. А. Круподьорова, В. Ю. Барштейн, Г. П. Мегалінська // Науковий часопис НПУ імені М. П. Драгоманова. Серія 20. Біологія. – 2012. – №4. – С. 113–119.
11. Бісько Н. А. Скринінг лікарських грибів для культивування на відходах харчової промисловості / Н. А. Бісько, Т. С. Іванова, В. Ю. Барштейн [та ін.] // Біотехнологія ХХІ століття: V регіональна науково-практична конференція викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів, 26 квітня 2011 р. – Київ, 2011. – С. 59.
12. Іванова Т. С. Культивування лікарських грибів на субстраті з хлібної крихти в якості основи для створення функціональних продуктів / Т. С. Іванова, Л. А. Антоненко, А. П. Мегалінська // Биология растений и биотехнология: Первая конференция молодых ученых (с международным участием) : сборник тезисов, 5-7 октября 2011 г. – Белая Церковь, 2011. – С. 99.
13. Иванова Т. С. Утилизация продуктов переработки зернового сырья лекарственными грибами / Т. С. Иванова, Л. А. Титова, А. П. Мегалинская // Актуальные проблемы биоэкологии : Материалы Международной научной конференции, 23–25 октября 2014 г. – Минск, 2014. – С. 80–81.
14. Іванова Т. С. Сухарна крихта як субстрат для культивування лікарських грибів / Т. С. Іванова, Л. О. Тітова, Г. П. Мегалінська // Біотехнологія ХХІ століття : IX Всеукраїнська науково-практична конференція, 24 квітня 2015 р. : тези допов. – К., 2015. – С. 43.
15. Ivanova T. Submerged cultivation of medicinal mushroom mycelia on the breadcrumb / T. Ivanova, N. Bisko, L. Titova, G. Megalinska // Molecular

Microbiology and Biotechnology : Abstracts of International scientific conference (Odessa, 21–23 June 2016). – Odessa, 2016. – P. 17.

16. Ivanova T. S. Utilization of Bioethanol By-Products in Process of Macromycetes Cultivation / T. S. Ivanova, N. A. Bisko, L. O. Titova, S. P. Tsugankov // Current Problems of Biology and Ecology : Materials of International Scientific and Practical Conference (Vinnytsia, 3–7 October 2016). – Vinnytsia, 2016. – P. 115–117.

## РОЗДІЛ 4

### ДИНАМІКА ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ВІДІБРАНИХ ВИДІВ ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ НА СУХАРНІЙ КРИХТІ

#### 4.1. Динаміка накопичення біомаси та морфологія культур відібраних видів лікарських макроміцетів при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сахарною крихтою

Одною з важливих ознак, за якою відбувається відбір грибів-продуцентів, є кількість утвореної в процесі культивування маси міцелію [1]. Дослідження показали, що на середовищі з сахарною крихтою підібраної концентрації найбільшу біомасу *S. commune* IBK 1768 накопичував на 3-тю добу культивування  $21,1 \pm 0,5$  г/дм<sup>3</sup>, *T. versicolor* IBK 353 – на 5-ту добу  $15,8 \pm 0,5$  г/дм<sup>3</sup>, *F. velutipes* IBK 1878  $14,0 \pm 0,4$  г/дм<sup>3</sup> та *G. lucidum* IBK 1900  $10,3 \pm 0,4$  г/дм<sup>3</sup> – на 7-му добу (рис. 4.1).

При глибинному культивуванні *S. commune* на детоксифікованому гідролізаті лузги рису [2] утворювалось значно менше біомаси  $7,29 \pm 0,05$  г/дм<sup>3</sup> та за довший період часу (14 діб), ніж на сахарній крихті. Під час глибинного культивування *S. commune* на комплексному середовищі з глюкозою та меласою максимальна концентрація біомаси була  $5,9$  г/дм<sup>3</sup> для штаму 441 та  $8,8$  г/дм<sup>3</sup> для штаму 1760, збагачення комплексного середовища пивним суслом призвело до утворення ще меншої кількості біомаси  $2,7$  г/дм<sup>3</sup> [3].

За даними літератури [4] при глибинному культивуванні *T. versicolor* протягом 7 діб на пивному суслі отримали для різних штамів від  $0,91$  г/дм<sup>3</sup> до  $8,21$  г/дм<sup>3</sup> біомаси, на живильному середовищі з молочної сироватки показники концентрації біомаси (від  $4,61$  г/дм<sup>3</sup> до  $16,27$  г/дм<sup>3</sup> для різних штамів) були більшими, ніж на пивному суслі, проте меншими, ніж на



живильному середовищі з сухарною крихтою. При цьому, максимальні значення біомаси в цьому дослідженні були отримані саме для штаму *T. versicolor* IBK 353.

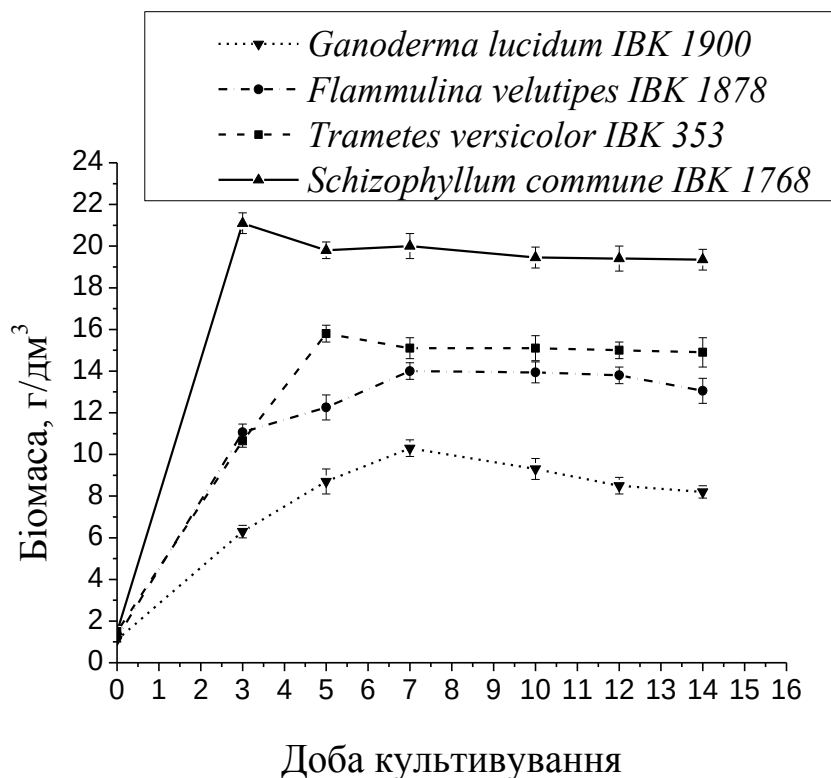


Рис. 4.1. Динаміка накопичення біомаси різними видами лікарських грибів на середовищах з оптимальними концентраціями сухарної крихти

В інших дослідженнях при культивуванні *T. versicolor* протягом 7 діб на комплексному середовищі з додаванням молочної сироватки було отримано меншу концентрацію біомаси (від 8,9 г/дм³ до 10,6 г/дм³ для різних штамів) [5]. При глибинному культивуванні на солодовому екстракті [6] протягом 8 діб *T. versicolor* синтезувала 11,6 г/дм³ біомаси.

При глибинному культивуванні штаму *F. velutipes* IBK 1878 на відході виробництва ПАТ «Київська макаронна фабрика» (крихта) було отримано максимальну кількість біомаси на 7-му добу (близько 23 г/дм³), а на відході виробництва ПБКФ «Ганоль» (СО<sub>2</sub>-шрот амаранту) – на 10-ту добу 27 г/дм³

біомаси [7]. При глибинному культивуванні *F. velutipes* на пивному суслі утворювалось 3,2 г/дм<sup>3</sup> біомаси [8].

В дослідженні [9] глибинного культивування двох штамів *F. velutipes* було отримано від 7 г/дм<sup>3</sup> до 24 г/дм<sup>3</sup> біомаси (в залежності від складу живильних середовищ) за 6-7 діб. Як джерело Карбону для живильних середовищ у цьому дослідженні використовували глюкозу, рослинну олію та мелясу у різних поєднаннях з джерелами Нітрогену: соєве борошно, пептон, дріжджовий екстракт з нітратом натрію та кукурудзяний екстракт з нітратом натрію; кожне середовище містило також дигідрофосфат калію та сульфат магнію.

За даними літератури [8-13], при глибинному культивуванні *G. lucidum* концентрація біомаси досить суттєво відрізняється в залежності від складу живильного середовища. Подібні до наших були отримані дані при глибинному культивуванні *G. lucidum* на пивному суслі – 6,9 г/дм<sup>3</sup> [8], на крохмальній крупці (максимальна біомаса 7,0 г/дм<sup>3</sup> на 9-ту добу культивування [10]), на комплексному синтетичному середовищі з додаванням насіння соняшника та шроту насіння соняшника – 9,4 г/дм<sup>3</sup> та 9,0 г/дм<sup>3</sup> відповідно на 6-ту добу [11], на середовищі з борошном сої та соняшnikовою олією – 11,0-11,4 г/дм<sup>3</sup> на 6-ту добу [12]. В той же час, більшу кількість біомаси було отримано при культивуванні *G. lucidum* на молочній (29,6 г/дм<sup>3</sup> на 5-ту добу) [10] та підсирній (20,1 г/дм<sup>3</sup> на 7-му) [13] сироватках.

Цікаво відмітити, що при використанні посівного матеріалу *G. lucidum* ІВК 1900, вирощеного на ГПДА (на відміну від наступних дослідів із глибинно вирощеним посівним матеріалом на сухарній крихті), ми спостерігали дивауксію [14]. Дослідження динаміки концентрації редукувальних речовин у культуральній рідині протягом глибинного культивування *G. lucidum* на сухарній крихті [14] підтвердило те, що саме

диауксія спричинила двохфазний ріст *G. lucidum* (оскільки крива концентрації редукувальних речовин мала два піки).

Явище диауксії добре вивчене для бактерій [15-17] і пов'язується із катаболітною репресією [15], коли на рівні транскрипції субстрат, що забезпечує швидкий ріст, репресує синтез тих ферментів, які необхідні для використання іншого субстрату. Х. Карстрем у 1930 р. виявив закономірність [17], що ферменти для розщеплення розповсюджених субстратів, таких як глюкоза, фруктоза, лактат, піруват або сукцинат, синтезуються конститутивно, тоді як ферменти для використання рідкісних цукрів або органічних кислот відносяться до індукцибельних. Зокрема, відомо [17], що виділення деполімераз, таких як амілаза, за умов росту мікробів на середовищі з крохмалем затримується у присутності відповідного мономеру (глюкози). Диауксія на кривій росту спостерігалась також при вивченні глибинного культивування лікарських макроміцетів *G. lucidum* [18, 19] та *G. frondosa* [20].

Одним із найбільш важливих факторів, що регулюють ріст та синтез вторинних метаболітів базидієвими грибами в культурі, є рН живильного середовища. Цей фактор обумовлює фізіологічну активність культур, впливає на властивості клітинних стінок, транспорт поживних речовин, швидкість росту та характер метаболізму, а також на здатність засвоювати ті чи інші поживні речовини [21].

Значення рН культуральної рідини змінювалось протягом культивування грибів від початкового і коливалось в межах 3,6-5,3 (рис. 4.2). Найменші значення рН спостерігалися при найбільших значеннях біомаси для всіх видів. Результати нашого подальшого дослідження глибинного культивування *G. lucidum* ІВК 1900 на сухарній крихті показали [14], що при найвищій концентрації біомаси відбувається найбільше накопичення органічних кислот у культуральній рідині, при цьому динаміка рН культуральної рідини має обернену залежність до динаміки накопичення

органічних кислот. Ці спостереження підтверджуються іншими дослідниками [22]. Водночас, існує припущення [1], що зниження рН живильного середовища до 4,0-3,4 в процесі глибинного культивування макроміцетів може інгібувати подальший ріст культур.

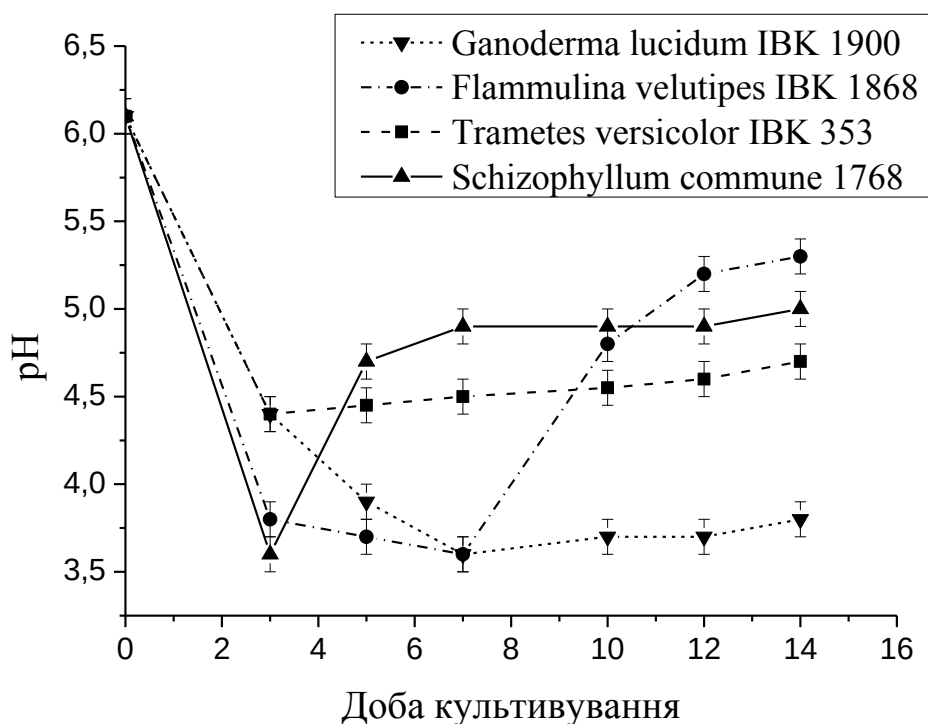


Рис. 4.2. Динаміка рН культуральної рідини різних видів лікарських грибів на середовищах з оптимальними концентраціями сахарної крихти

Найбільша швидкість росту обраних продуцентів при глибинному культивуванні на сахарній крихті спостерігалась (табл. 4.1) від початку культивування до 3-ої доби (від 1,73 г/дм<sup>3</sup>×добу до 6,53 г/дм<sup>3</sup>×добу). Дослідження швидкості росту продуцентів показало, що макроміцети утилізували субстрат сахарну крихту видоспецифічно.

Так, при культивуванні *S. commune* IBK 1768 виявилось, що на 5-ту добу біомаса почала значно знижуватись у порівнянні з 3-ою добою (табл. 4.1). Це можна пояснити тим, що макроміцети при глибинному культивуванні на сахарній крихті росли у вигляді агломератів, а при

вичерпуванні поживних речовин і кисню у середовищі всередині колоній відбувається лізис [23, 9]. *S. commune* IBK 1768 при культивуванні на сухарній крихті накопичувало найбільшу біомасу у порівнянні з іншими дослідженими видами, тому, можливо, ефект лізису колоній всередині агломератів, і, як наслідок, зменшення біомаси після досягнення піку, спостерігалось більш виражено, ніж для інших видів.

Таблиця 4.1

**Швидкість росту продуцентів при глибинному культивуванні  
на сухарній крихті, г/дм<sup>3</sup>×добу**

| Види та штами макроміцетів            | Доба культивування |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                       | 3                  | 5     | 7     | 10    | 12    | 14    |
| <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 | 6,53               | -0,65 | 0,10  | -0,18 | -0,03 | -0,03 |
| <i>Trametes versicolor</i> IBK 353    | 3,05               | 2,58  | -0,35 | 0,00  | -0,05 | -0,05 |
| <i>Flammulina velutipes</i> IBK 1878  | 3,29               | 0,60  | 0,87  | -0,02 | -0,07 | -0,38 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> IBK 1900     | 1,73               | 1,20  | 1,30  | -0,33 | -0,40 | -1,15 |

Ріст *T. versicolor* IBK 353 відбувався до 5-ої доби, а після 7-ої доби концентрація біомаси залишалась без змін (табл. 4.1). Як і у випадку *S. commune* IBK 1768, після досягнення максимальної біомаси, спостерігалось її зменшення, проте менш виражене.

Повільніше за попередні два види росли *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900, накопичуючи міцеліальну масу до 7-ої доби (табл. 4.1). Так як період культивування значно впливає на вартість процесу, глибинне культивування *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 на живильному середовищі з сухарною крихтою є більш економічно вигідним.

В літературі [26] описаний ріст макроміцетів у глибинній культурі у вигляді міцеліальних агрегатів, або „кульок”, гладких або пухнастих, щільних та з порожниною всередині, а також дисперсний ріст у вигляді окремих гіф. Характер росту міцеліальної колонії у може змінюватися в залежності від генетичних властивостей організму та від умов культивування [27]. Мофологія культур, в свою чергу, впливає на продуктивність утворення певних метаболітів та на властивості живильного середовища [27].

Слід зазначити, що ріст макроміцетів у глибинній культурі відрізняється від росту одноклітинних організмів, оскільки за рахунок фізико-хімічної взаємодії між клітинними стінками відбувається механічне зчеплення клітинних стінок гіф та утворення агрегатів [28]. На відміну від росту окремих клітин, ріст міцеліальних культур у вигляді агрегатів відбувається не за експоненціальним законом, а пропорційно третьому ступеню часу (зі швидкістю збільшення об'єму агрегату) [29]. Ріст у формі агрегатів має свої переваги (простота відокремлення біомаси, кращі умови для утворення аромату, зниження густини культуральної рідини) та недоліки (недостатнє забезпечення поживними речовинами, негомогенний ріст) [23].

Міцелій *G. lucidum* IBK 1900 та *F. velutipes* IBK 1878 при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою ріс у вигляді гладких агрегатів, діаметр яких складав 0,3-3,0 мм під час стаціонарної фази. При глибинному культивуванні з використанням субстрату з сухарною крихтою морфологія міцелію *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 дещо відрізнялась від вищезгаданих видів – ріст відбувався у формі пухнастих агрегатів діаметром від 0,5 мм до 3,0 мм (рис. 4.3). З наближенням розміру агрегатів досліджених макроміцетів до 3 мм ми спостерігали появу порожнини всередині агрегатів. Її наявність може бути пояснена дефіцитом кисню та поживних речовин всередині колонії [23, 9].

На відміну від отриманих нами даних про морфологічні структури міцелію *G. lucidum* при глибинному культивуванні на живильному

середовищі з сухарною крихтою, було встановлено, що при глибинному культивуванні *G. lucidum* на крохмальній крупці та молочній сироватці [10], утворюються міцеліальні агрегати неправильної форми із нитчастим ростом на поверхні.

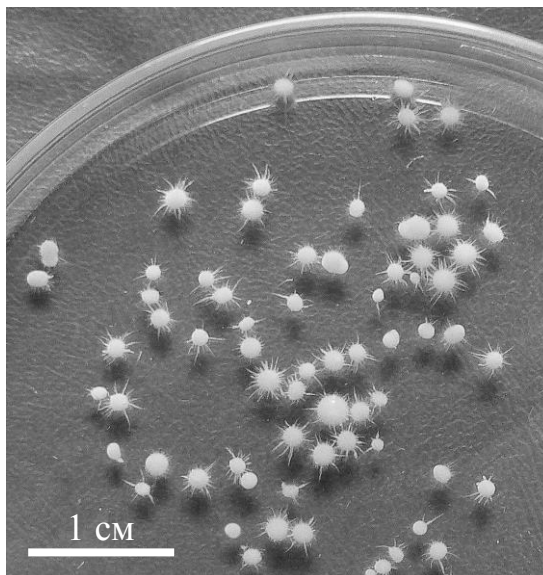


Рис. 4.3. Загальний вигляд агрегатів *T. versicolor* IBK 353 на 5-ту добу глибинного культивування на живильному середовищі з сухарною крихтою

При глибинному культивуванні *T. versicolor* на середовищах із пивного суслу, молочної сироватки, картопляно-глюкозному, середовищі Норкранс та Норкранс з додаванням відвару дубової кори, а також глюкозо-пептонному та глюкозо-амонійному середовищах утворювали три типи морфологічних структур: гладенькі кульки, кульки з ворсинками та видовжені гладенькі палички [4]. Розмір структур варіював у залежності від складу середовища та штаму. При цьому, за дослідженнями О. С. Горшиної [30], штами *T. versicolor*, які швидко ростуть, у глибинній культурі мають схильність до дрібноглобулярного та дисперсного росту.

Ефективність біоконверсії субстрату (табл. 4.2) коливалась в межах від 17 % до 40 % і досягла максимуму на 3-тю добу для *S. commune* IBK 1768, на 5-ту добу для *T. versicolor* IBK 353, на 7-му добу для *F. velutipes* IBK 1878 та для *G. lucidum* IBK 1900. Схожі показники ефективності біоконверсії

субстрату (від 22 % до 40 %) були встановлені іншими авторами [24] при глибинному культивуванні базидієвого гриба *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer.

Найбільш ефективно та за найкоротший період часу відбувалась біоконверсія сухарної крихти макроміцетом *S. commune* IBK 1768 (табл. 4.2). Інші досліджені гриби на 3-тю добу культивування мали ефективність біоконверсії субстрату на 15,4-22,4 % меншу, ніж *S. commune* IBK 1768. На другому місці після *S. commune* IBK 1768 максимальну ефективність біоконверсії сухарної крихти одночасно із накопиченням максимальної біомаси досягла *T. versicolor* IBK 353. Максимальна ефективність біоконверсії субстрату для *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900 спостерігалась через дві доби після досягнення максимальної ефективності біоконверсії субстрату *T. versicolor* IBK 353.

Таблиця 4.2

**Ефективність біоконверсії субстрату лікарськими макроміцетами при глибинному культивуванні на сухарній крихті, %**

| Види та штами макроміцетів            | Доба культивування |              |              |       |       |       |
|---------------------------------------|--------------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|
|                                       | 3                  | 5            | 7            | 10    | 12    | 14    |
| <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 | <b>39,81</b>       | 36,42        | 36,78        | 35,77 | 35,68 | 35,59 |
| <i>Trametes versicolor</i> IBK 353    | 23,50              | <b>34,87</b> | 27,30        | 27,30 | 33,11 | 32,88 |
| <i>Flammulina velutipes</i> IBK 1878  | 24,41              | 27,06        | <b>30,90</b> | 30,77 | 30,46 | 28,80 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> IBK 1900     | 17,38              | 24,00        | <b>28,42</b> | 25,66 | 23,45 | 22,62 |

Таким чином, в результаті дослідження біотехнологічних параметрів (накопичення біомаси, швидкості росту продуценту та ефективності біоконверсії субстрату) глибинного культивування видів лікарських



макроміцетів на поживному середовищі з сухарною крихтою були обрані *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768.

#### 4.2. Динаміка глибинного культивування *Trametes versicolor* IBK 353 та *Schizophyllum commune* IBK 1768 на середовищі з сухарною крихтою

Для того, щоб точно визначити період культивування для *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353, які найкраще росли на живильному середовищі з сухарною крихтою, була досліджена більш детальна динаміка накопичення біомаси (рис. 4.4), а також динаміки накопичення сирого протеїну та ендополісахаридів для зазначених видів.

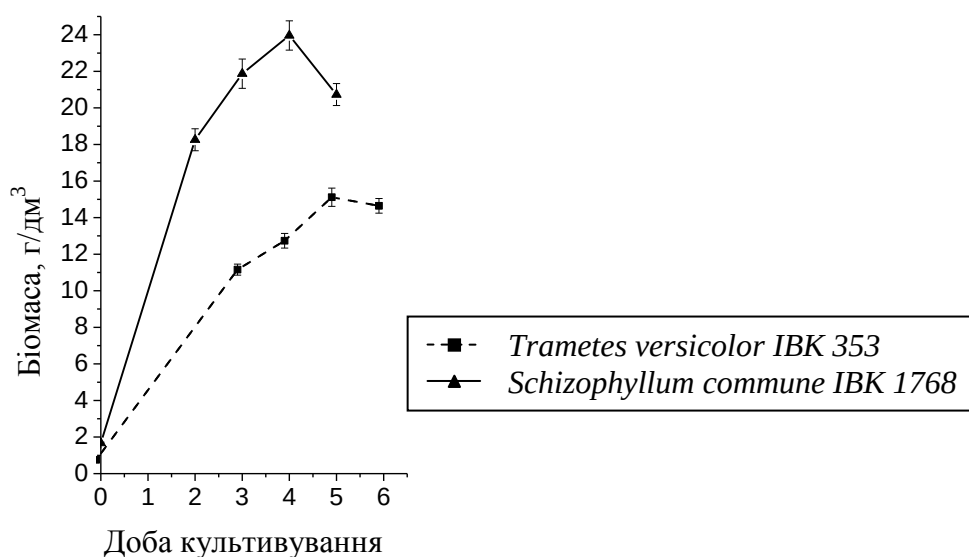


Рис. 4.4. Динаміка накопичення біомаси лікарських макроміцетів при глибинному культивуванні на середовищах з оптимальними концентраціями сухарної крихти

Наші дослідження показали (рис. 4.4), що максимальну концентрацію біомаси  $15,76 \pm 0,5$  г/дм³ *T. versicolor* IBK 353 утворює на 5-ту добу глибинного культивування на поживному середовищі з сухарною крихтою.

Значення рН культуральної рідини при глибинному культивуванні *T. versicolor* IBK 353 на сухарній крихті знижувалось від початкового значення поживного середовища  $6,1 \pm 0,1$  до  $4,4 \pm 0,1$  на 3-тю добу культивування, після чого рН трохи підвищувалось до кінця культивування.

За розрахунками кінетичних параметрів глибинного культивування *T. versicolor* IBK 353, на живильному середовищі з сухарною крихтою найвища швидкість росту спостерігалась на третю добу (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

### Кінетичні параметри процесу глибинного культивування

#### *T. versicolor* IBK 353 на живильному середовищі з сухарною крихтою

| №<br>п/п | Параметри                                                                  | Доба культивування |       |       |       |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|
|          |                                                                            | 3                  | 4     | 5     | 6     |
| 1        | Швидкість росту, г/дм <sup>3</sup> за добу                                 | 3,47               | 3,00  | 2,87  | -     |
| 2        | Швидкість утворення<br>ендополісахаридів, г/дм <sup>3</sup> за добу        | 0,21               | 0,20  | 0,19  | 0,16  |
| 3        | Продуктивність біосинтезу<br>ендополісахаридів, мг/дм <sup>3</sup> за добу | 17,80              | 14,95 | 12,18 | 10,68 |
| 4        | Швидкість утворення білка, г/дм <sup>3</sup> за<br>добу                    | 0,74               | 0,64  | 0,61  | 0,51  |
| 5        | Продуктивність біосинтезу білка,<br>мг/дм <sup>3</sup> за добу             | 62,99              | 48,02 | 38,58 | 33,36 |

Примітка. “-” – приріст культури відсутній.

Після споживання більшої частини поживних речовин із середовища, культура грибів перейшла до стаціонарної фази росту, при цьому швидкість росту сповільнювалась, поки гриби не досягли максимальної концентрації

біомаси. До останньої досліджуваної доби культивування концентрація біомаси знизилась і розпочалася фаза старіння культури.

При дослідженні динаміки культивування *T. versicolor* IBK 353 від 3-ої до 6-ої доби вміст ендopolісахаридів та сирого протеїну незначно підвищувався. При цьому, відсоток ендopolісахаридів у міцелії *T. versicolor* був у 10 разів вищим при культивуванні на середовищі з сухарною крихтою, ніж при культивуванні на комплексному живильному середовищі з додаванням молочної сироватки [5]. При дослідженні динаміки накопичення сирого протеїну в біомасі *T. versicolor* при глибинному культивуванні на пивному суслі [25] його вміст також трохи зростав протягом періоду культивування (13,04 % сирого протеїну на 5-ту добу, 13,86 % – на 10-ту добу та 14,63 % – на 15-ту добу), проте був меншим на (5,4-7,0) %, ніж при культивуванні на сухарній крихті. При поверхневому культивуванні на рідкому живильному середовищі з екстрактом солоду протягом 14 діб були отримані дані [25] вмісту сирого протеїну у міцелії *T. versicolor* (17,8 %) більш наближені до отриманих нами при культивуванні на сухарній крихті.

Максимальне накопичення сирого протеїну та ендopolісахаридів відбувалось на 6-ту добу, становило 20,03 % та 6,42 % відповідно. Крива накопичення біомаси не співпадала із кривою накопичення білку та ендopolісахаридів, оскільки міцелій *T. versicolor* IBK 353 накопичував максимальну концентрацію цих первинних метаболітів після досягнення максимальної біомаси. Разом з тим, максимальні концентрації ендopolісахаридів та сирого протеїну спостерігались при максимальних концентраціях біомаси (рис. 4.5).

Ефективність біоконверсії субстрату макроміцетом *T. versicolor* IBK 353 сягала максимальних значень одночасно з отриманням найбільшої концентрації біомаси (рис. 4.3, 4.4) – на 5-ту добу культивування (34,78 %).

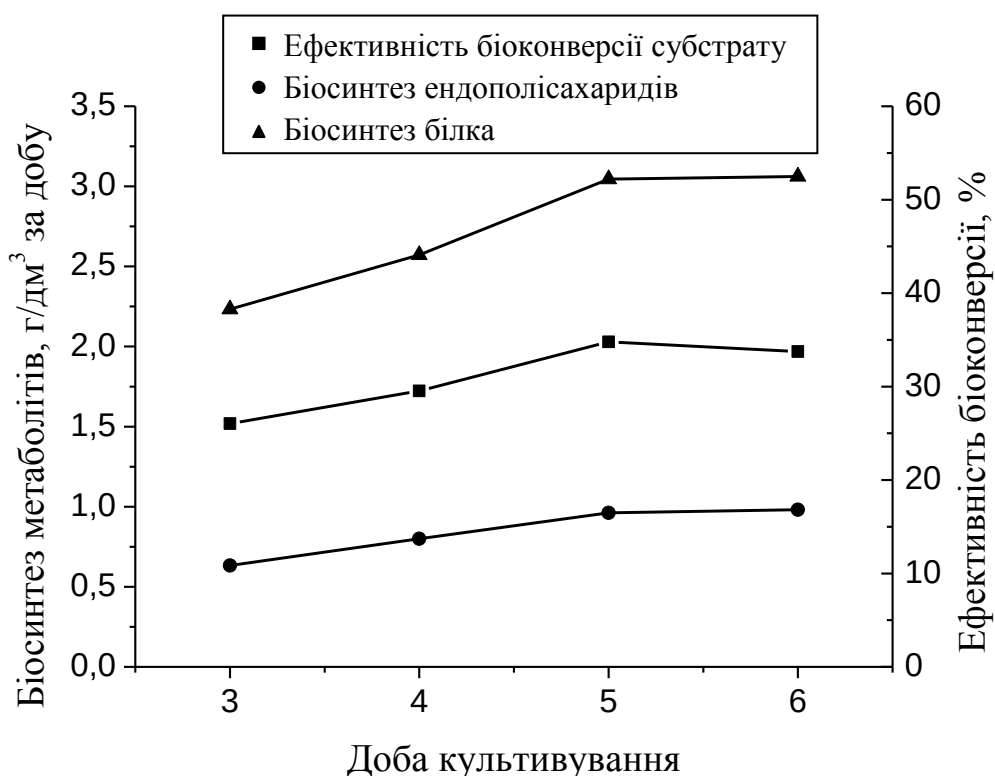


Рис. 4.5. Біотехнологічні параметри процесу глибинного культивування *T. versicolor* IBK 353 на живильному середовищі з сахарною крихтою

Наші дослідження показали (рис. 4.4), що *S. commune* IBK 1768 утворює максимальну концентрацію біомаси ( $23,96 \pm 0,8$  г/дм<sup>3</sup>) за 4 доби при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сахарною крихтою. Значення рН культуральної рідини змінювалося більш суттєво при глибинному культивуванні під час активного синтезу біомаси: від початкового ( $6,1 \pm 0,1$ ) до  $3,6 \pm 0,1$  на 3-тю добу культивування.

За розрахунками кінетичних параметрів (табл. 4.4), найшвидший ріст біомаси *S. commune* IBK 1768 спостерігався до 2-ої доби. Максимальну кількість ендополісахаридів (7,13 %) *S. commune* накопичував на 5-ту добу культивування, а максимальну кількість білку (18,83 %) – на 4-ту добу культивування. Підвищення вмісту цих первинних метаболітів було незначним протягом досліджених діб культивування та, як і при культивуванні *T. versicolor* IBK 353, не співпадало з кривою росту біомаси.

Таблиця 4.4

**Кінетичні параметри процесу глибинного культивування  
*S. commune* IBK 1768 на живильному середовищі з сухарною крихтою**

| №<br>п/п | Параметри                                                                  | Доба культивування |       |       |       |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|
|          |                                                                            | 2                  | 3     | 4     | 5     |
| 1        | Швидкість росту, г/дм <sup>3</sup> за добу                                 | 8,30               | 6,73  | 5,57  | -     |
| 2        | Швидкість утворення<br>ендополісахаридів, г/дм <sup>3</sup> за добу        | 0,56               | 0,48  | 0,41  | 0,30  |
| 3        | Продуктивність біосинтезу<br>ендополісахаридів, мг/дм <sup>3</sup> за добу | 30,39              | 21,80 | 17,01 | 14,28 |
| 4        | Швидкість утворення білка, г/дм <sup>3</sup><br>за добу                    | 1,59               | 1,34  | 1,13  | 0,80  |
| 5        | Продуктивність біосинтезу білка,<br>мг/дм <sup>3</sup> за добу             | 87,08              | 61,12 | 47,06 | 38,69 |

Примітка. “-” – приріст культури відсутній.

Вміст ендopolісахаридів був на 14-22 % більшим у біомасі *S. commune* IBK 1768, ніж у біомасі *T. versicolor* IBK 353, проте вміст сирого протеїну, навпаки, був вищим на 2-8 % у біомасі *T. versicolor* IBK 353, ніж у біомасі *S. commune* IBK 1768 при однаковому періоді культивування.

Максимальна ефективність біоконверсії субстрату при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою для *S. commune* IBK 1768 спостерігалась на 4-у добу (рис. 4.6). Слід зазначити, що біоконверсія детоксифікованого гідролізату лузги рису *S. commune* була менш ефективною (24 %) [2], ніж обраного нами субстрату.

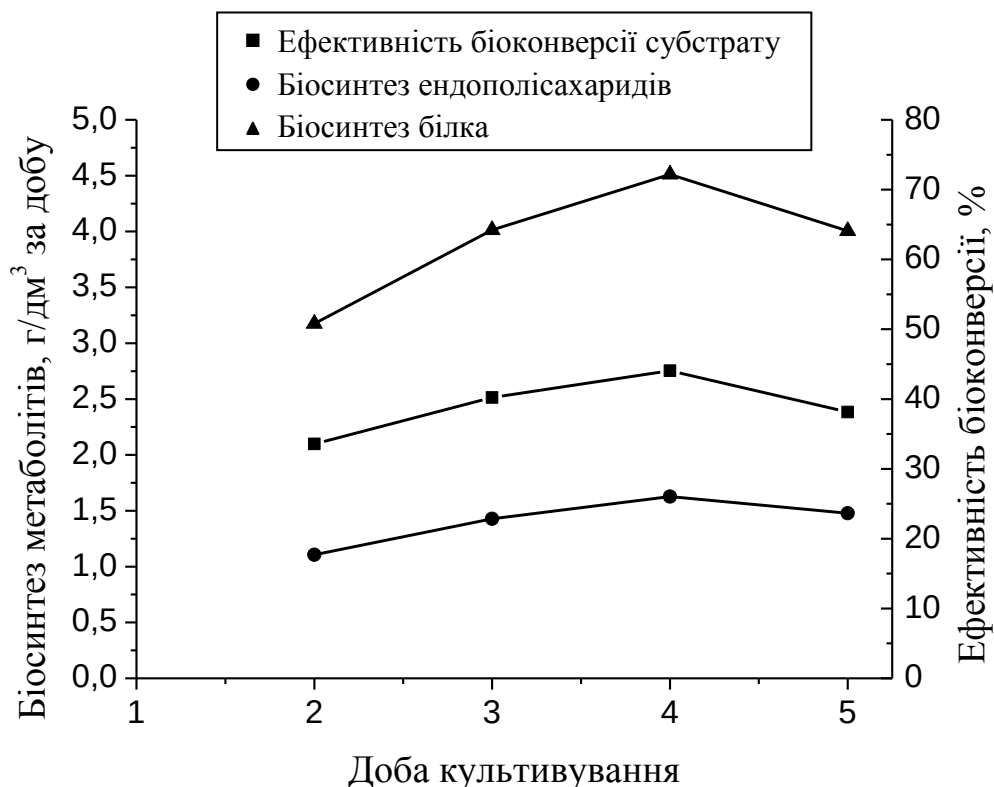


Рис. 4.6. Біотехнологічні параметри процесу глибинного культивування лікарських макроміцетів на живильному середовищі з сахарною крихтою

Отже, в результаті дослідження динаміки накопичення біомаси (рис. 4.4), біосинтезу ендополісахаридів, сирого протеїну та розрахунку ефективності біоконверсії субстрату (рис. 4.5, 4.6), для отримання цільового продукту та дослідження біохімічного складу міцелію були обрані 4-та доба глибинного культивування на живильному середовищі з сахарною крихтою для *S. commune* IBK 1768 та 5-та доба для *T. versicolor* IBK 353.

Нами було встановлено, що при глибинному культивуванні *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 утворюють на 18-51 % більше біомаси та за коротший на 29-43 % період часу, ніж *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900, тому перші два види були обрані для подальших досліджень. Показано, що культивування *S. commune* IBK 1768 протягом 4 діб та *T. versicolor* IBK 353 протягом 5 діб сприяє ефективній утилізації сахарної крихти – відходу

хлібо-булочного виробництва. Біомаса, отримана внаслідок цієї біоконверсії, містить цінні первинні метаболіти, ендopolісахариди та білок, вміст яких підвищувався протягом культивування. На 4-ту добу культивування *S. commune* IBK 1768 накопичував 24 г/дм<sup>3</sup> біомаси із 7 % ендopolісахаридів та 19 % сирого протеїну; *T. versicolor* IBK 353 на 5-ту добу накопичував 16 г/дм<sup>3</sup> біомаси із 6 % ендopolісахаридів та 20 % сирого протеїну. Вищезазначені періоди культивування були обрані для отримання цільового продукту – біомаси лікарських макроміцетів та детальнішого аналізу вмісту біологічно активних речовин.

Основні наукові результати розділу опубліковані у працях: [14, 31-33].

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Михайлова О. Б., Бухало А. С. Сумчатые грибы рода *Morchella* Dill. / Н. А. Бисько, В. Г. Бабицкая, А. С. Бухало [и др.] // Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборн. научн. трудов в двух томах. Т. 2 / Под ред. С. П. Вассера. – Киев, 2012. – 459 с.
2. Shu Ch. H. Production of schizophyllan glucan by *Schizophyllum commune* ATCC 38548 from detoxificated hydrolysate of rice hull / Ch. H. Shu, H. J. Hsu // J. Taiwan Inst. Chem. E. – 2011. – Vol. 42. – P. 387–393.
3. Ліновицька В. М. Ріст і біосинтетична активність *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray та *Schizophyllum commune* Fr. (Basidiomycota) у глибинній культурі / В. М. Ліновицька, А. С. Бухало // Ukr. Bot. J. – 2008. – Т. 65, № 1. – С. 116–123.
4. Клечак І. Р. Особливості росту *Coriolus versicolor* у глибинній культурі / І. Р. Клечак, Н. Ю. Митропольська, Л. О. Антоненко, О. І. Нишпорська // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2009. – Т. 20, № 1. – С. 130–133.
5. Cui J. Characterisation and Bioactivity of Protein-Bound Polysaccharides from Submerged-Culture Fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 / J. Cui, K. K. Tha Goh, R. Archer, H. Singh // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 34. – P. 393–402.
6. Жилинская Наталия Викторовна. Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill: Fr.) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. и *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Lloyd.: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов: дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Жилинская Наталия Викторовна; [Место защиты: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "МГУ им. Ломоносова"], 2015.- 195 с.



7. Попович В. П. Вивчення оптимальної технології культивування біомаси *Flammulina velutipes* / В. П. Повович, Н. А. Бісько, Т. А. Круподьорова [та ін.] // Фармацевтичний часопис. – 2014. – № 1. – С. 89–92.
8. Поединок Н.Л. Влияние на ростовую активность посівного материала культивируемых макромицетов низкоинтенсивного лазерного излучения / Н. Л. Поединок, О. Б. Михайлова, В. М. Ходаковский, И. А. Дудка // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1. – С. 77–86.
9. Shuktueva M. I. Submerged cultivation and chemical composition of *Flammulina velutipes* mycelium / M. I. Shuktueva, A. V. Avtonomova, Ya. A. Masyutin [et al.] // Башкирский химический журнал. – 2011. – Т.18. – № 4. – С. 144–148.
10. Круподьорова Т.А. Біологічні особливості *Ganoderma applanatum* (Perst.:Wallr.) Pat. та *G. lucidum* (Curtis:Fr.) P.Karst. в культурі: автореф. дис. ... к.б.н.: 03.00.21 / Круподьорова Тетяна Анатоліївна; Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. – К., 2009. – 21 с.
11. Curvetto N. Sunflower seed-based medium for growth of *Ganoderma* spp. / N. Curvetto, R. Gonzalez-Matute, D. Figlas, S. Delmastro // Mushroom Biology and Mushroom Products: Proceedings of the 4th International Conf., 20-23 February, 2002. – Cuernavaca, Mexico. – 2002. – P. 205–211.
12. Гарибова Л. В. Рост и морфологические признаки мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* в зависимости от условий культивирования / Л. В. Гарибова, А. В. Антимонова, Л. А. Завьялова, Л. М. Краснопольская // Микология и фитопатология. – 2003. – № 3. – С. 14–19.
13. Lee H. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics / H. Lee, M. Song, Y. Yu, S. Hwang // Biochem. Eng. J. – 2003. – Vol. 15. – P. 93–99.
14. Іванова Т. С. Особливості глибинного культивування *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. на хлібній крихті / Т. С. Іванова, Н. А. Бісько,

- Т. А. Круподьорова, В. Ю. Барштейн // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2012. – Т. 83, №3 (хімічні і біологічні науки і технології). – С. 30–35.
15. Підгорський В. С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу: монографія / В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська, Т. П. Пирог; НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – К.: Наук. думка, 2010. – 328 с.
  16. Современная микробиология. Прокариоты : В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – 656 с.
  17. Современная микробиология. Прокариоты : В 2-х томах. Т. 2. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – 656 с.
  18. Papinutti L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex / L. Papinutti // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 1941–1946.
  19. Xu P. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media / P. Xu, Zh.-Y. Ding, Zh. Qian [et. al.] // Enzyme Microb. Technol. – 2008. – Vol. 42. – P. 325–331.
  20. Shih I.-L. Study of mycelia growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa* / I.-L. Shih, B.-W. Chou, Ch.-Ch. Chen [et. al.] // Bioresour. Technol. – 2008. – Vol. 99. – P. 785–793.
  21. Бабицкая В. Г., Щерба В. В., Пучкова Т. А., Бисько Н. А. Биологически активные соединения съедобных и лекарственных грибов (С. 76-344) / Н. А. Бисько, В. Г. Бабицкая, А. С. Бухало [и др.] // Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборн. научн. трудов в двух томах. Т. 2 / Под ред. С. П. Вассера. – Киев, 2012. – 459 с.

22. Elisashvili V. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocess and Products (Review) / V. Elisashvili // Int. J. Med. Mushrooms. – 2012. – Vol. 14. – Iss. 3. – P. 211-239.
23. Metz B. Biotechnology Review: The Growth of Molds in the Form of Pellets / B. Metz, N. W. F. Kossen // Biotechnol. Bioeng. – 1977. – Vol. 19. – Iss. 781. – P. 781–799.
24. Wu J.-Zh. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer – Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency / J.-Zh. Wu, P. C.-K. Cheung, K.-H. Wong, N.-L. Huang // Food Chem. – 2003. – Vol. 81, Iss. 3. – P. 389–393.
25. Ковалева, Гульмира Кажгалиевна. Биологические особенности и биохимический состав ксилотрофных базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. и *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat : автореф. дис. ... к. б. н.: 03.00.24 Микология / Ковалева Гульмира Кажгалиевна; [Место защиты: МГУ им. Ломоносова. Биол. фак.]. – Москва, 2009. – 21 с.
26. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. – К. : Наукова думка, 1988. – 144 с.
27. Enman J. Fungal production and solid state chemistry of eritadenine: an integrated approach to development of an active pharmaceutical ingredient. Doctoral thesis. Lulea University of Technology. Sweden, 2009. – 52 p.
28. Кадималиев Д. А. Влияние различно замещенных пирролохинолонов на физиолого-биохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* / Д. А. Кадималиев, И. С. Степаненко, О. С. Надежина, С. А. Ямашкин // Микология и фитопатология. – 2014. – Т. 48, Вып. 5. – С. 309–314.
29. Bailey J. E. Biochemical Engineering Fundamentals / J. E. Bailey, D. F. Ollis. – NY : McGraw-Hill, 1986. – 984 p.

30. Горшина Е.С. Технология получения биологически активной субстанции лекарственного гриба кориола опушеного / Е. С. Горшина, М. М. Скворцова, В. В. Бирюков // Биотехнология. – 2003. – № 2. – С. 45–53.
31. Ivanova T. S. Breadcrumb as a New Substrate for *Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune* Submerged Cultivation / T. S. Ivanova, N. A. Bisko, T. A. Krupodorova, V. Yu. Barshteyn // Korean J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol.42, Iss.1. – P. 67–72.
32. Іванова Т. С. Біохімічні особливості глибинного культивування лікарського бізидіоміцета *Ganoderma lucium* (CURTIS) P. KARST / Т. С. Іванова, Т. А. Круподьорова // Ukr. Biochem. J. – Київ. – 2011. – Т. 83, № 4. – С. 141.
33. Иванова Т. С. Скрининг базидиомицетов – продуцентов ценных биологически активных веществ при культивировании на растительных отходах пищевой промышленности / Т. С. Иванова, Н. А. Бисько, В. Ю. Барштейн [и др.] // Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения: Научн.-практ. конф., 23–28 мая 2011 г. – Крым, Новый Свет, 2011. – С. 363.

## РОЗДІЛ 5

### БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* IBK 1768 ТА *TRAMETES VERSICOLOR* IBK 353 ПРИ ГЛИБИННОМУ КУЛЬТИВУВАННІ НА СУХАРНІЙ КРИХТІ

Харчова цінність – це поняття, що відображає корисні властивості харчового продукту, включаючи ступінь забезпечення фізіологічних потреб людини в основних харчових речовинах, таких як білки, жири, вуглеводи, вітаміни та мінеральні речовини [1, 2].

Біологічна цінність харчових продуктів визначається наявністю в них незамінних факторів харчування, що не синтезуються в організмі, або синтезуються у обмежених кількостях та з малою швидкістю (незамінні амінокислоти, ненасичені жирні кислоти, вітаміни, мінеральні речовини та біологічно активні речовини, такі як фосфоліпіди та глікопротеїнові комплекси) [1]. Вміст таких речовин у міцелію грибів залежить від багатьох факторів, у тому числі від субстрату, на якому вони культивуються. Слід відмітити, що інформація про хімічний склад міцелію грибів є обмеженою в порівнянні з даними хімічного складу плодових тіл їстівних грибів [3].

#### 5.1. Біохімічна характеристика міцеліальної маси *Schizophyllum commune* IBK 1768 та *Trametes versicolor* IBK 353

Отримані нами результати свідчать, що міцелій *S. commune* IBK 1768 та сухарна крихта містять близькі значення зольності (табл. 3.1, 5.1). В той же час, міцелій *S. commune* IBK 1768 містив у три рази більше золи (4,5 %) при культивуванні на рідкому середовищі з відходом виробництва амарантової олії (шротом після CO<sub>2</sub>-екстракції), проте цей субстрат мав у 1,7 разів вищий

вміст золи, ніж сухарна крихта [4]. Так як плодові тіла *S. commune* вживаються в їжу в тропічних країнах, харчова цінність плодових тіл досліджена краще, ніж міцелію. За даними літератури зольність плодових тіл *S. commune* коливалася в межах від 7,46 % до 8,00 % [5, 6].

*Schizophyllum commune* IBK 1768

*Trametes versicolor* IBK 353



Рис. 5.1. Біохімічний склад міцелію грибів при культивуванні на сухарній крихті

На відміну від *S. commune* IBK 1768, зольність міцелію *T. versicolor* IBK 353 була майже в два рази вищою, ніж субстрату (рис. 3.1, 5.1). Однак, при глибинному культивуванні *T. versicolor* IBK 353 на оптимізованому комплексному середовищі з пивним суслом було отримано [7] біомасу із вищим у 3,8 рази вмістом зольності, а в плодових тілах [8] та при глибинному культивуванні *T. versicolor* на глюкозо-пептоно-дріжджовому (ГПД) середовищі [9] зольність була вищою в 1,8-1,9 рази. При поверхневому культивуванні на живильному середовищі з солодовим екстрактом [10] зольність міцелію *T. versicolor* мала найбільш наближене значення (4,6 %) до отриманого нами при глибинному культивуванні на сухарній крихті.

Вміст сирого жиру та сирого протеїну в міцелії *S. commune* IBK 1768 був у 7,2 та 1,7 разів відповідно вище, ніж у сухарній крихті (рис. 5.1). При культивуванні *S. commune* IBK 1768 на відході виробництва амарантової олії було отримано вищий вміст сирого жиру та сирого протеїну (8,4 % та 45,4 %

відповідно), проте вміст цих компонентів у субстраті був також вищим (1,5 % та 15,4 % відповідно) [4]. У плодових тілах *S. commune*, навпаки, вміст сирого жиру був нижчим (1,28% [5] та 2,0 % [6]), ніж у міцелії при культивуванні на сухарній крихті. Вміст сирого протеїну значно коливався у плодових тілах *S. commune*: від 9,63 % до 27,7 % [5, 6, 11].

Вміст сирого жиру та сирого протеїну в міцелії *T. versicolor* IBK 353, отриманому при культивуванні на сухарній крихті, відрізнявся приблизно на 1 % від вмісту відповідних компонентів у міцелії *S. commune* IBK 1768, отриманому при культивуванні на цьому ж субстраті (табл. 5.1).

При глибинному культивуванні *T. versicolor* IBK 353 на середовищі ГПД міцелій містив на 2,3 % менше білку та в 1,8 рази менше сирого жиру, ніж при вирощуванні на середовищі з сухарною крихтою [9]. Водночас, при глибинному культивуванні *T. versicolor* IBK 353 на оптимізованому комплексному середовищі з пивним суслом вміст сирого жиру був подібним (3,3 %), а вміст білку був вищим (32 %) [7], ніж при культивуванні на сухарній крихті. При глибинному культивуванні *T. versicolor* на пивному суслі протягом 5-15 діб в міцелії містилося від 13,04 % до 14,63 % сирого протеїну, а також від 1,02 % до 1,49 % сирого жиру [3]. При поверхневому культивуванні на поживному середовищі з солодовим екстрактом [10] вміст сирого жиру та сирого протеїну міцелію *T. versicolor* був наближеним (3,0 % та 17,8 % відповідно) до даних, отриманих нами при глибинному культивуванні на сухарній крихті.

Слід зазначити, що додавання додаткового джерела Нітрогену в живильне середовище підвищує вихід білку в біомасі *T. versicolor* [12]. За даними літератури, плодові тіла *T. versicolor* містили від 1,1 % [8] до 1,9 % [3] сирого жиру та порівняно з даними по хімічному складу міцелію значно нижчий відсоток сирого протеїну – від 4,2 % [8] до 7,25 % [3].

При глибинному культивуванні *S. commune* та *T. versicolor* на середовищі ГПД з додаванням кукурудзяного екстракту загальний вміст

ліпідів у міцелії складав 7,1-7,4 % та 6,0-7,0 % відповідно, в залежності від штаму [13]. При цьому, у міцеліальній масі було отримано: 0,28-0,55 г/дм<sup>3</sup> сирого жиру при культивуванні *S. commune* та 0,34-0,61 г/дм<sup>3</sup> – при культивуванні *T. versicolor*. В наших дослідженнях, при культивуванні на сухарній крихті було отримано 0,83 г/дм<sup>3</sup> сирого жиру в міцеліальній масі *S. commune* та 0,37 г/дм<sup>3</sup> сирого жиру – *T. versicolor*.

Загалом, макроміцети мають низький загальний вміст сирих жирів (від 1,1 % до 10 % [14,15]), які складаються із різних класів ліпідних сполук, включаючи вільні жирні кислоти, моногліцериди, фосфоліпіди, стерини тощо [15]. Варто також відмітити, що за даними літератури [16] гриби «білої гнилі» (які здатні розкласти лігнін у субстратах), зокрема, *S. commune* та *T. versicolor*, синтезують меншу кількість ліпідів у порівнянні з грибами «бурої гнилі» (які в субстратах розкладають целюлозу, а лігнін не розкладають).

Отримані нами дані показують, що вміст вуглеводів у міцелії *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 менше на 15 % та 20 % відповідно у порівнянні з вмістом вуглеводів у сухарній крихті (табл. 3.1, 5.1). Вміст вуглеводів у міцелії *T. versicolor* IBK 353, отриманому при глибинному культивуванні на сухарній крихті, був меншим на 6,9 %, ніж при культивуванні на екстракті солоду [10] та більшим на 7,8-16,54 %, ніж при культивуванні на пивному суслі [3].

Розрахунок енергетичної цінності показав, що 100 г міцелію грибів та сухарної крихти становить близько 16-17 % потреби у енергії при добовому раціоні харчування 2000 кКал: 331,89 кКал (1389,56 кДж) – *S. commune* IBK 1768 та 314,38 кКал (1316,25 кДж) – *T. versicolor* IBK 353. Енергетична цінність міцелію *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 в наших дослідженнях була в межах показників даних літератури [4–8, 11, 15].



### 5.1.1. Вміст амінокислот

Вміст незамінних амінокислот в біомасі макроміцетів за даними літератури коливається в межах від 34 % до 47 %, а превалюють замінні амінокислоти – глутамінова кислота (від 12,6 % до 24,0 %), аспарагінова кислота (від 9,1 % до 12,1 %) та аргінін (3,7 % до 13,9 %) [17].

Згідно до наших досліджень (табл. 5.1), білок *S. commune* IBK 1768 можна вважати білком із високою біологічною цінністю, оскільки кількість незамінних амінокислот на 100 г амінокислот перевищує 40 г [18]. В той же час, вміст незамінних амінокислот в біомасі *T. versicolor* IBK 353 на 100 г амінокислот наближається до 40, а в сухарній крихті – майже вдвічі менший (табл. 5.1). Співвідношення сумарного вмісту незамінних амінокислот до вмісту решти для *S. commune* IBK 1768 становить 0,71, для *T. versicolor* IBK 353 – 0,60, а для сухарної крихти – 0,36.

Аналіз даних літератури виявив, що при поверхневому культивуванні *S. commune* IBK 1768 на середовищі зі шротом амаранту після вуглекислотної екстракції вміст незамінних амінокислот складав 33,7 г на 100 г амінокислот, співвідношення незамінних амінокислот до вмісту решти було 0,51 [19].

При дослідженні амінокислотного складу плодових тіл *S. commune* виявилось, що незамінні амінокислоти складають 34 % від загальної суми амінокислот, а співвідношення до вмісту решти – 0,52 [6].

При глибинному культивуванні *T. versicolor* IBK 353 на оптимізованому комплексному середовищі з додаванням пивного сусла [7] та на середовищі ГПД [9] вміст незамінних амінокислот складав 34,39 г та 39,59 г відповідно на 100 г амінокислот, співвідношення незамінних амінокислот до вмісту решти було 0,52 та 0,66 відповідно. При глибинному культивуванні *T. versicolor* на пивному суслі фракція амінокислот містила 23,9 % незамінних амінокислот [3] (співвідношення до вмісту решти 0,31), а при поверхневому культивуванні на екстракті солоду – 31,8 % незамінних амінокислот [10] (співвідношення до вмісту решти 0,47).

Таблиця 5.1

**Амінокислотний склад міцелію макроміцетів при глибинному  
культивуванні на середовищі з сухарною крихтою**

| Амінокислоти |                          | <i>Schizophyllum commune</i><br>ІВК 1768 |                              | <i>Trametes versicolor</i> ІВК 353 |                              |
|--------------|--------------------------|------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
|              |                          | % від суми<br>амінокислот                | г на 100 г а.с.р.<br>біомаси | % від суми<br>амінокислот          | г на 100 г а.с.р.<br>біомаси |
| Незамінні    | Лізін                    | 5,38 ± 0,12                              | 0,829 ± 0,02                 | 4,84 ± 0,12                        | 0,713 ± 0,02                 |
|              | Треонін                  | 5,23 ± 0,12                              | 0,807 ± 0,02                 | 5,48 ± 0,12                        | 0,808 ± 0,02                 |
|              | Валін                    | 6,57 ± 0,12                              | 1,012 ± 0,02                 | 7,09 ± 0,12                        | 1,045 ± 0,02                 |
|              | Метіонін і<br>цистин     | 1,39 ± 0,11<br>3,37 ± 0,11               | 0,214 ± 0,02<br>0,522 ± 0,02 | 1,27 ± 0,11<br>2,73 ± 0,11         | 0,187 ± 0,02<br>0,402 ± 0,02 |
|              | Ізолейцин                | 3,90 ± 0,11                              | 0,602 ± 0,02                 | 2,84 ± 0,11                        | 0,419 ± 0,02                 |
|              | Лейцин                   | 7,24 ± 0,12                              | 1,119 ± 0,02                 | 6,84 ± 0,12                        | 1,008 ± 0,02                 |
|              | Фенілаланін і<br>тирозин | 4,16 ± 0,12<br>4,16 ± 0,11               | 0,642 ± 0,02<br>0,642 ± 0,02 | 3,53 ± 0,11<br>2,76 ± 0,11         | 0,521 ± 0,02<br>0,407 ± 0,02 |
|              | <b>Сума незамінних</b>   | <b>41,40 ± 1,04</b>                      | <b>6,389 ± 0,18</b>          | <b>37,38 ± 1,03</b>                | <b>5,510 ± 0,18</b>          |
| Замінні      | Гістидин                 | 2,18 ± 0,11                              | 0,343 ± 0,02                 | 1,41 ± 0,11                        | 0,208 ± 0,02                 |
|              | Аргінін                  | 5,98 ± 0,12                              | 0,923 ± 0,02                 | 5,54 ± 0,12                        | 0,816 ± 0,02                 |
|              | Аспарагінова кислота     | 9,69 ± 0,30                              | 1,493 ± 0,05                 | 10,03 ± 0,31                       | 1,479 ± 0,05                 |
|              | Серин                    | 6,25 ± 0,12                              | 0,963 ± 0,02                 | 6,60 ± 0,12                        | 0,972 ± 0,02                 |
|              | Глутамінова кислота      | 18,89 ± 0,32                             | 2,916 ± 0,05                 | 18,67 ± 0,31                       | 2,750 ± 0,05                 |
|              | Пролін                   | 3,87 ± 0,11                              | 0,597 ± 0,02                 | 7,32 ± 0,12                        | 1,078 ± 0,02                 |
|              | Гліцин                   | 4,82 ± 0,11                              | 0,745 ± 0,02                 | 5,51 ± 0,12                        | 0,811 ± 0,02                 |
|              | Аланін                   | 6,91 ± 0,12                              | 1,066 ± 0,02                 | 7,54 ± 0,12                        | 1,111 ± 0,02                 |
|              | <b>Сума замінних</b>     | <b>58,60 ± 1,31</b>                      | <b>9,037 ± 0,22</b>          | <b>62,62 ± 1,33</b>                | <b>9,225 ± 0,22</b>          |

Примітка. При підготовці зразків цистеїн окислюється до цистину, тому обидві амінокислоти визначаються разом.

Слід зазначити, що потреба організму людини в метіоніні задовольняється на 80-89 % замінною амінокислотою цистином, а у

фенілаланіні – на 70-75 % замінною амінокислотою тирозином, тому обидві названі пари амінокислот оцінюють разом при підрахунку суми незамінних амінокислот.

Таблиця 5.2

### Амінокислотний склад сухарної крихти

| Амінокислоти    |                       | % від суми амінокислот             | г на 100 г а.с.р. субстрату        |
|-----------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Незамінні       | Лізин                 | $1,32 \pm 0,11$                    | $0,104 \pm 0,01$                   |
|                 | Треонін               | $2,73 \pm 0,11$                    | $0,207 \pm 0,01$                   |
|                 | Валін                 | $4,12 \pm 0,12$                    | $0,326 \pm 0,01$                   |
|                 | Метіонін і цистин     | $1,24 \pm 0,11$                    | $0,098 \pm 0,01$                   |
|                 | Ізолейцин             | $1,49 \pm 0,11$                    | $0,118 \pm 0,01$                   |
|                 | Ізолейцин             | $2,42 \pm 0,11$                    | $0,190 \pm 0,01$                   |
|                 | Лейцин                | $6,06 \pm 0,12$                    | $0,478 \pm 0,01$                   |
|                 | Фенілаланін і тирозин | $4,23 \pm 0,12$                    | $0,334 \pm 0,01$                   |
|                 | тирозин               | $3,02 \pm 0,11$                    | $0,238 \pm 0,01$                   |
| Сума незамінних |                       | <b><math>26,63 \pm 1,02</math></b> | <b><math>2,093 \pm 0,09</math></b> |
| Замінні         | Гістидин              | $1,54 \pm 0,11$                    | $0,122 \pm 0,01$                   |
|                 | Аргінін               | $2,35 \pm 0,12$                    | $0,185 \pm 0,01$                   |
|                 | Аспарагінова кислота  | $4,59 \pm 0,12$                    | $0,362 \pm 0,01$                   |
|                 | Серин                 | $5,41 \pm 0,12$                    | $0,427 \pm 0,01$                   |
|                 | Глутамінова кислота   | $40,35 \pm 0,50$                   | $3,184 \pm 0,05$                   |
|                 | Пролін                | $12,87 \pm 0,21$                   | $1,017 \pm 0,02$                   |
|                 | Гліцин                | $3,26 \pm 0,11$                    | $0,258 \pm 0,01$                   |
|                 | Аланін                | $3,00 \pm 0,11$                    | $0,236 \pm 0,01$                   |
| Сума замінних   |                       | <b><math>73,37 \pm 1,40</math></b> | <b><math>5,797 \pm 0,13</math></b> |

Примітка. При підготовці зразків цистеїн окислюється до цистину, тому обидві амінокислоти визначаються разом.

Результати дослідження показали, що відсоток незамінних амінокислот у сумі амінокислот збільшився на 10,75 % у міцелію *T. versicolor*, та на 14,77 % – у міцелію *S. commune* у порівнянні з субстратом (табл. 5.1, 5.2).

Зокрема, відсоток незамінної амінокислоти лізину у фракції амінокислот збільшився в 3,7 раз у *T. versicolor*, а у *S. commune* – в 4,1 рази в порівнянні з субстратом, а сумарний вміст сульфуровмісних амінокислот (цистину та метіоніну) у фракції амінокислот – від 2,73 % у сухарній крихті до 4,76 % та 4,00 % у *S. commune* та *T. versicolor* відповідно. Так як не тільки відсоток незамінних амінокислот, а і загальний вміст сирого протеїну в сухарній крихті значно менший (майже вдвічі), ніж у міцелії грибів, культивованих на цьому субстраті, то загальний вміст незамінних амінокислот (виражений в грамах на 100 г а. с. р. зразку) також збільшується (в 2,6-3,1 рази) в грибах у порівнянні з субстратом (табл. 5.1, 5.2).

У сухарній крихті найбільший відсоток становить глютамінова кислота, її вміст зменшився у сумі амінокислот вдвічі у обох досліджених видів грибів у порівнянні з субстратом. Аспарагінова та глютамінова кислоти превалювали у профілі амінокислот міцелію *T. versicolor* та *S. commune*, що є типовим для грибів. На відміну від глютамінової кислоти, відсоток аспарагінової кислоти вдвічі підвищився у сумі амінокислот міцелію грибів у порівнянні з субстратом (табл. 5.1, 5.2).

Розрахунок амінокислотного скору (табл. 5.3) дав можливість констатувати, що порівняно з вимогами ФАО/ВООЗ біомаса *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353, отримані при глибинному культивуванні на поживному середовищі з сухарною крихтою, лімітовані за вмістом ізолейцину (79,93 % та 54,23 % відповідно). Сухарна крихта, на відміну від міцелію досліджених макроміцетів, лімітована за вмістом лізину (17,29 %). Показано [20], що за вмістом лізину лімітовані також пшениця, жито, ячмінь та інші зернові культури.

Серед незамінних амінокислот найбільша кількість у міцелію макроміцетів та в сухарній крихті припадає на валін та лейцин (табл. 5.1, 5.2). Проте, якщо врахувати рекомендації ФАО/ВООЗ щодо співвідношення незамінних амінокислот у білку [18], то в білку сухарної крихти

співвідношення жодної амінокислоти не відповідає співвідношенню такої амінокислоти до решти амінокислот в еталонному білку (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

**Амінокислотний скор, %**

| Амінокислоти          | Сухарна крихта | <i>Trametes versicolor</i> IBK 353 | <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 | Білок корв'ячого молока [20] | Білок рису [20] |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Лізин                 | 17,29          | 67,09                              | 80,05                                 | 142                          | 70              |
| Треонін               | 47,30          | 104,55                             | 107,15                                | 110                          | 87              |
| Валін                 | 59,60          | 108,18                             | 107,48                                | 128                          | 122             |
| Метіонін і цистин     | 56,40          | 87,11                              | 111,69                                | 94                           | 108             |
| Ізолейцин             | 43,43          | 54,23                              | 79,93                                 | 118                          | 110             |
| Лейцин                | 62,41          | 74,53                              | 84,90                                 | 136                          | 123             |
| Фенілаланін і тирозин | 87,15          | 80,05                              | 113,65                                | 170                          | 143             |

В той же час, білок *S. commune* IBK 1768, отриманий при глибинному культивуванні на сухарній крихті, може вважатися хорошим джерелом фенілаланіну, тирозину, метіоніну, цистину, валіну та треоніну (скор більше 100 %, табл. 5.3). За показниками скору білок *S. commune* IBK 1768 наближається до білку рису (табл. 5.3). В свою чергу, білок *T. versicolor* IBK 353, отриманий при глибинному культивуванні на сухарній крихті, містить рекомендовані ФАО/ВООЗ кількості валіну та треоніну (табл. 5.3).

Якщо врахувати, що 1 г ідеального білку містить 360 мг незамінних амінокислот, то можливим є встановлення певних показників якості білку за вмістом незамінних амінокислот (табл. 5.4). Найкращі показники

спостерігалися для міцелію *S. commune* IBK 1768, а найгірші – для субстрату сухарної крихти. За показниками харчової цінності білок їстівних грибів коливається в таких межах [21]: індекс незамінних амінокислот становить від 70,3 % до 98,7 %, прогнозована біологічна цінність – від 64,9 % до 95,9 %, а індекс поживності коливається від 3,3 % до 31,8 %.

Таблиця 5.4

### Показники харчової цінності білків

| Показник                                           | Сухарна крихта | <i>Trametes versicolor</i> IBK 353 | <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 |
|----------------------------------------------------|----------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Амінокислотний скор, % (лімітувальна амінокислота) | 17,3 (лізин)   | 54,2 (ізолейцин)                   | 79,9 (ізолейцин)                      |
| Індекс незамінних амінокислот (ЕАА, %)             | 53,14          | 79,22                              | 94,25                                 |
| Прогнозована біологічна цінність (BV, %)           | 46,22          | 74,65                              | 91,03                                 |
| Індекс поживності (NI, %)                          | 5,81           | 15,31                              | 17,75                                 |

Отже, міцелій досліджуваних грибів, культивованих на сухарній крихті, був значно краще збалансований за співвідношенням незамінних і замінних амінокислот, а також мав вищий у порівнянні з субстратом вихід незамінних амінокислот. За показниками вмісту незамінних амінокислот, хімічного скору, індексу незамінних амінокислот та прогнозованою біологічною цінністю білок міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманого при глибинному культивуванні на сухарній крихті, можна вважати білком високої біологічної цінності.

### 5.1.2. Жирнокислотний профіль

У складі ліпідів базидіальних грибів за даними літератури знайдені такі самі жирні кислоти, які зустрічаються в інших еукаріотних організмів (насичені та ненасичені з 12-18 атомами Карбону в ланцюгу) [16]. У складі ненасичених жирних кислот базидієвих грибів превалюють ліолева (C 18:2) та олеїнова (C 18:1), а у складі насичених – пальмітинова (C 16:0) [16], що співпадає з результатами нашого дослідження (рис. 5.1-5.3).

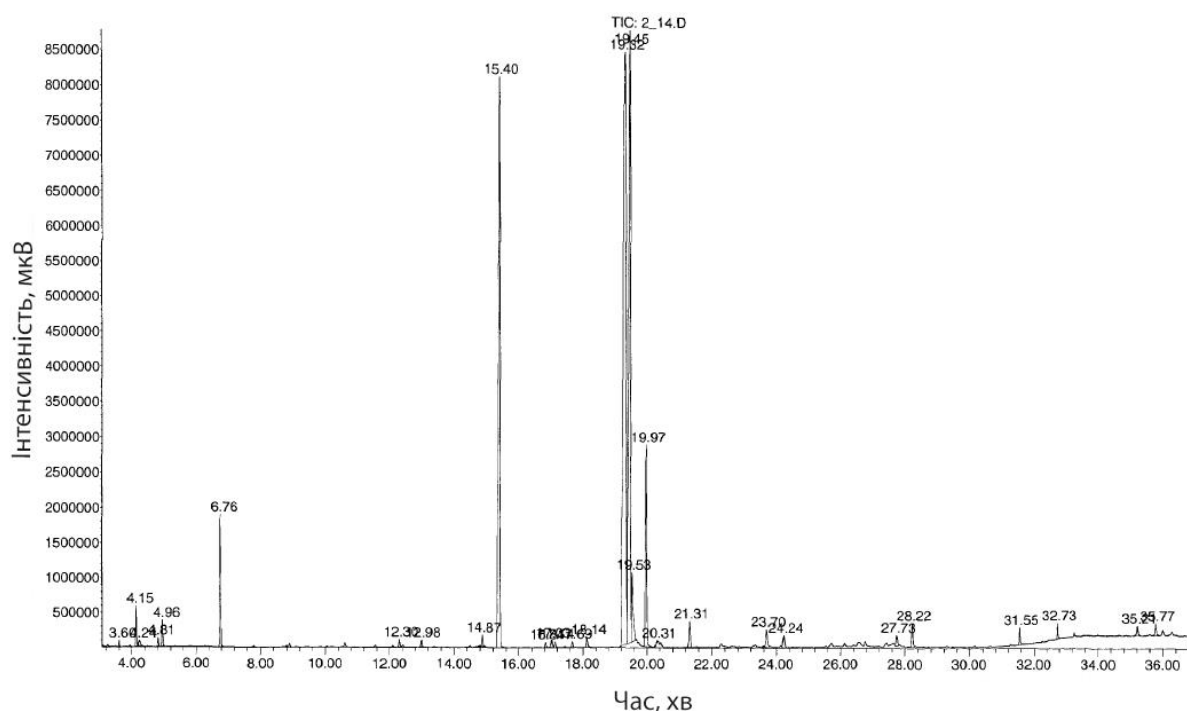


Рис. 5.2. Хроматограма метилових ефірів жирних кислот зразку міцелію *S. commune* 1768, отриманого при глибинному культивуванні на сухарній крихті (4-та доба). Колонка капілярна HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм.

Загальний вигляд графіків газової хроматограми метилових ефірів жирних кислот був подібним для міцелію *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353 та для сухарної крихти із основними піками розповсюдженості жирних кислот на 15,39-15,40 хв, 19,37-19,32 хв та 19,40-19,45 хв (рис. 5.1-

5.3), що відповідають гексадекановій (пальмітиновій), 9,12-октадекадієновій (C18:2) та 9-октадеценевій (C 18:1) жирним кислотам (рис. 5.1-5.3).

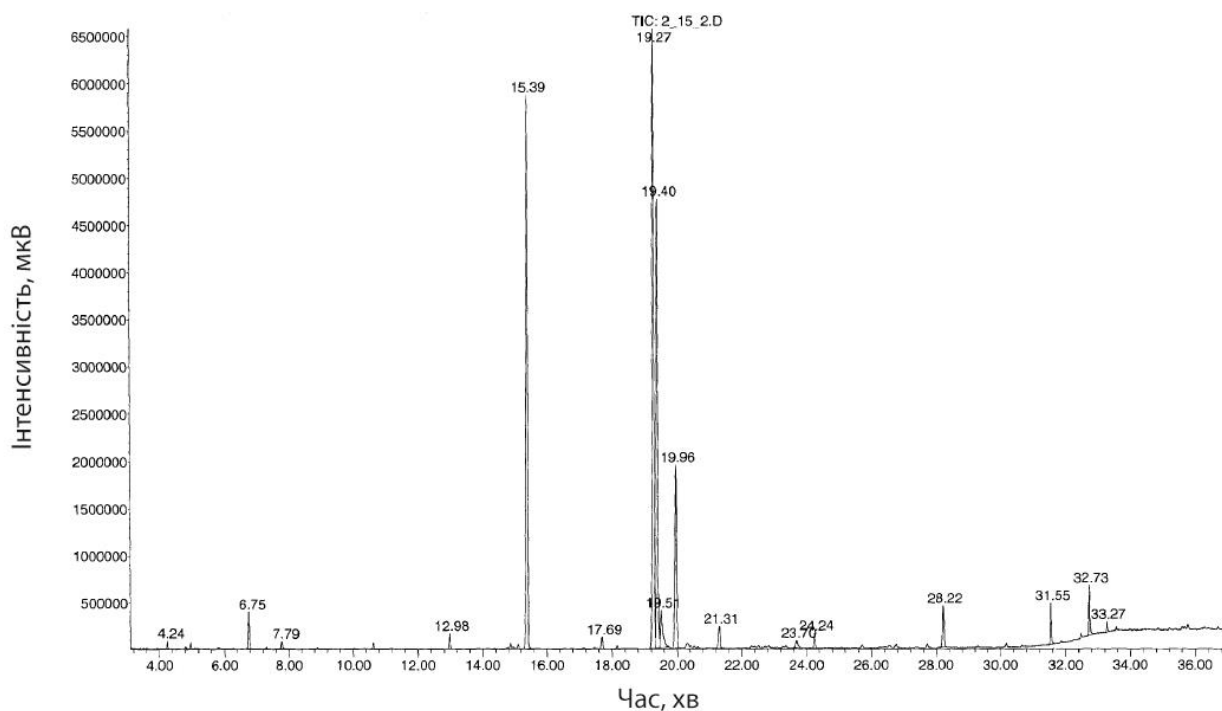


Рис. 5.3. Хроматограма метилових ефірів жирних кислот зразку міцелію *T. versicolor* 353, отриманого при глибинному культивуванні на сухарній крихті (5-та доба). Колонка капілярна HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм.

У фракції жирних кислот досліджуваних зразків (міцелію *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353 та в сухарній крихті) превалювали ненасичені жирні кислоти (табл. 5.5). При цьому, найбільший відсоток серед ненасичених мали жирні кислоти із 18 атомами Карбону (октадеценова та октадекадієнова), а серед насичених — із 16 атомами Карбону (гексадеканова).

Співвідношення ненасичених жирних кислот до насичених складало 2,15 для *S. commune* IBK 1768, 1,53 для *T. versicolor* IBK 353 та 2,05 для сухарної крихти. Ступінь ненасиченості мав значення 0,98 для *S. commune* IBK 1768, 0,93 для *T. versicolor* IBK 353 та 0,99 для сухарної крихти.



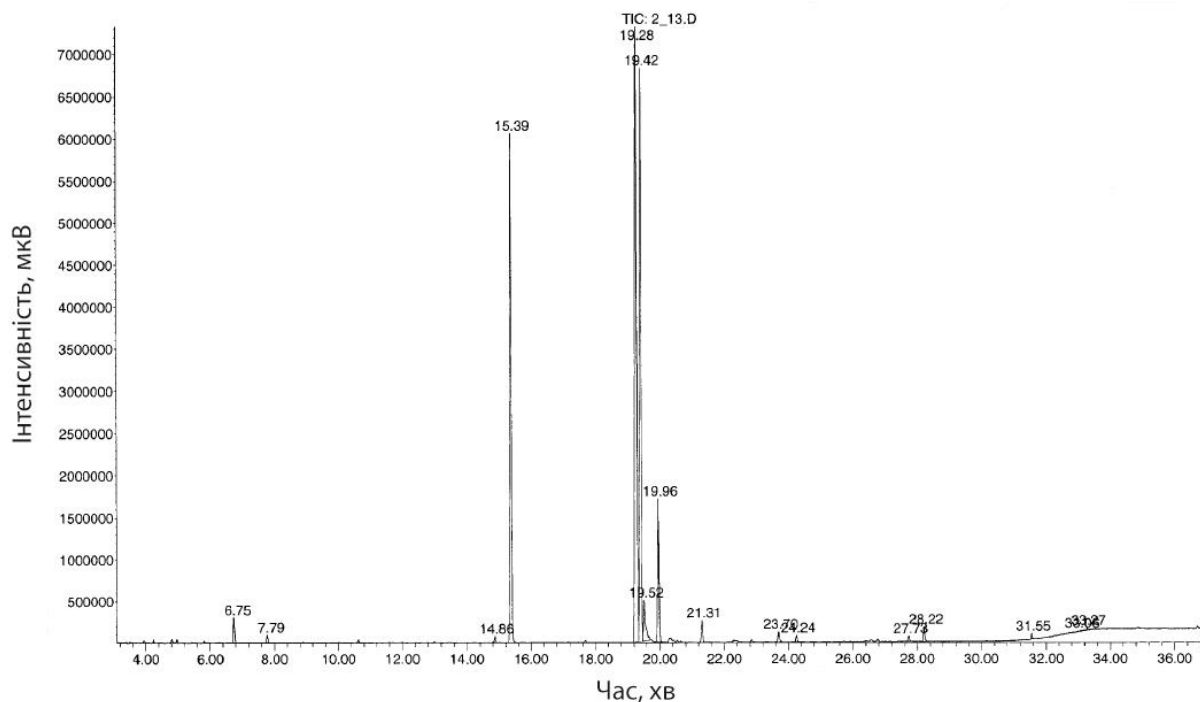


Рис. 5.4. Хроматограма метилових ефірів жирних кислот зразку сухарної крихти. Колонка капілярна HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм.

При поверхневому культивуванні *S. commune* IBK 1768 на середовищі зі шротом амаранту після вуглекислотної екстракції відсоток ненасичених жирних кислот у фракції жирних кислот складав 78,6 % [4]. При глибинному культивуванні *S. commune* на середовищі ГПД відсоток ненасичених жирних кислот (75,95 %) [16] від загальної кількості жирних кислот був подібний до відповідного показника у плодових тілах *S. commune* (76,5 %) [6].

При глибинному культивуванні *T. versicolor* на середовищі ГПД відсоток ненасичених жирних кислот складав від 68,45 % до 72,6 % [16, 9], на оптимізованому комплексному середовищі з додаванням пивного сусла – 75,9 % [7], а при глибинному культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі з додаванням кукурудзяного екстракту – 80 % [13].

Таблиця 5.5

**Жирнокислотний профіль, %**

| Жирні кислоти           |                 | Код<br>кислоти | Сухарна<br>крихта   | <i>Trametes<br/>versicolor</i> IBK<br>353 | <i>Schizophyllum<br/>commune</i> IBK 1768 |
|-------------------------|-----------------|----------------|---------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>Ненасичені</b>       | Гексадеценава   | 16:1           | 0,28 ± 0,02         | -                                         | 0,37 ± 0,02                               |
|                         | Октадеценава    | 18:1           | 32,07 ± 0,31        | 23,45 ± 0,21                              | 29,67 ± 0,33                              |
|                         | Октадекадієнова | 18:2           | 34,84 ± 0,32        | 36,59 ± 0,33                              | 37,89 ± 0,38                              |
|                         | Ейкозенова      | 20:1           | -                   | 0,41 ± 0,02                               | -                                         |
|                         | Доказенова      | 22:1           | -                   | -                                         | 0,35 ± 0,01                               |
| <b>Сума ненасичених</b> |                 |                | <b>67,18 ± 0,65</b> | <b>60,45 ± 0,56</b>                       | <b>68,28 ± 0,74</b>                       |
| <b>Насичені</b>         | Пентадеканова   | 15:0           | -                   | 0,61 ± 0,03                               | 0,39 ± 0,02                               |
|                         | Гексадеканова   | 16:0           | 25,61 ± 0,19        | 25,92 ± 0,16                              | 22,93 ± 0,27                              |
|                         | Гептадеканова   | 17:0           | -                   | 0,50 ± 0,03                               | 0,34 ± 0,02                               |
|                         | Октадеканова    | 18:0           | 6,04 ± 0,10         | 8,27 ± 0,08                               | 6,49 ± 0,08                               |
|                         | Ейкозанова      | 20:0           | 0,30 ± 0,02         | 0,65 ± 0,03                               | 0,39 ± 0,02                               |
|                         | Докозанова      | 22:0           | 0,69 ± 0,03         | 1,91 ± 0,01                               | 0,76 ± 0,04                               |
|                         | Тетракозанова   | 24:0           | 0,18 ± 0,01         | 1,31 ± 0,01                               | 0,42 ± 0,02                               |
|                         | Гексакозанова   | 26:0           | -                   | 0,38 ± 0,02                               | -                                         |
| <b>Сума насичених</b>   |                 |                | <b>31,83 ± 0,35</b> | <b>39,55 ± 0,37</b>                       | <b>31,72 ± 0,47</b>                       |

Відомо, що в порівнянні з іншими організмами, ліпіди мембрани лігнолітичних грибів (до яких належать *S. commune* та *T. versicolor*) містять значно більшу кількість ненасичених жирних кислот, передусім лінолевої кислоти [22]. При розкладанні лігніну високий вміст ненасичених жирних кислот грибам необхідний для детоксикації феноловмісних сполук за рахунок продуктів перекисного окислення ліпідів, а також для утворення перекису водню на шляху окиснення лінолевої кислоти, необхідного для функціонування більшості лігнолітичних ферментів [22]. Тобто високий вміст ненасичених жирних кислот має адаптивне значення.

### 5.1.3. Вміст вітамінів

Гриби є цінним джерелом деяких вітамінів, таких як тіамін, рибофлавін, ніацин та фолати [17]. Зокрема, більшість досліджених видів грибів містять тіамін у кількостях не менших, ніж зернові продукти, а вміст рибофлавіну у більшості їстівних грибів перевищує вміст у овочах та злаках [23].

Міцелії обох досліджуваних видів грибів, отриманих при глибинному культивуванні на сухарній крихті, виявили схожі закономірності накопичення вітамінів із найвищим вмістом ніацину (рис. 5.5). В плодових тілах *S. commune* вміст ніацину також був найбільший серед досліджуваних вітамінів [5], проте у 6,4 разів менше, ніж у міцелії, культивованому на сухарній крихті. Рівень тіаміну в плодових тілах *S. commune* [5] був подібним, а рівень рибофлавіну – у чотири рази нижчим, ніж у міцелії, отриманому при культивуванні на сухарній крихті.

В той же час, якщо порівнювати вміст вітамінів у міцелії *T. versicolor* IBK 353, отриманому після глибинного культивування на сухарній крихті та оптимізованому комплексному середовищі з додаванням пивного суслу, то вміст рибофлавіну та ніацину був подібним у міцелії після культивування на двох середовищах, але вміст тіаміну був у 1,7 разів вище після культивування на сухарній крихті, а вміст фолацину був у 4,7 разів вище після культивування на оптимізованому комплексному середовищі з додаванням пивного суслу [7].

Із 100 г сухарної крихти (із загальним вмістом досліджуваних вітамінів  $1,3 \text{ мг} \pm 0,1 \text{ мг}$ ) після 4 днів культивування було отримано  $44,5 \text{ г} \pm 2,0 \text{ г}$  міцелію *S. commune* (висушеного при  $60^\circ\text{C}$ ), що містив  $4,33 \text{ мг} \pm 0,16 \text{ мг}$  досліджуваних вітамінів. З іншого боку, з 100 г сухарної крихти після 5 днів культивування було отримано  $35,9 \text{ г} \pm 1,2 \text{ г}$  міцелію *T. versicolor* IBK 353 (висушеного при  $60^\circ\text{C}$ ), що містив  $4,56 \text{ мг} \pm 0,29 \text{ мг}$  досліджуваних вітамінів. Таким чином, міцелій *T. versicolor* IBK 353 мав вищий вміст вітамінів, але

культивування *S. commune* IBK 1768 для отримання вітаміновмісної сировини виявилось більш ефективним через коротший термін культивування та вищий вихід біомаси.

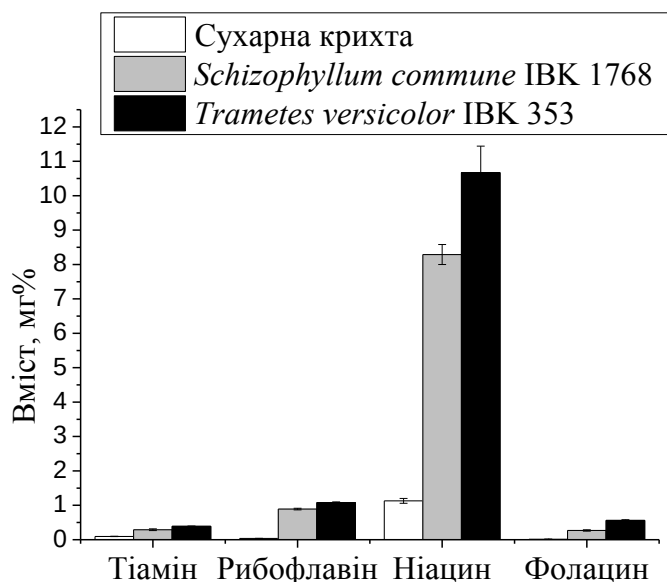


Рис. 5.5. Вміст вітамінів у біомасі лікарських макроміцетів та в субстраті

Згідно чинних Норм фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії МОЗ України [24], добова потреба дорослого населення у вітамінах складає для чоловіків та жінок відповідно, мг: тіамін – 1,6 та 1,3; рибофлавін – 2,0 та 1,6; ніацин – 22 та 16; фолати – 0,4. За джерелом [25], продукт вважається збагаченим на вітаміни при умові, що його добова порція містить від 15 % до 50 % вітамінів від норми фізіологічної потреби людини.

Якщо порахувати середнє арифметичне добової потреби вітамінів для дорослого населення (табл. 5.6), то виявляється, що 100 г сухарної крихти містить лише 2,11-6,55 % добової норми досліджуваних вітамінів. В той же час, при добовій порції 50 г, висушений міцелій зазначених видів лікарських макроміцетів, отриманий при культивуванні на сухарній крихті, може забезпечити від 10 до 70 % добової потреби у досліджених вітамінах.

Таблиця 5.6

**Частка вітамінів у зразках (100 г) від добової норми, %**

| Вітаміни   | Середня добова норма для дорослого населення, мг% [24] | Сухарна крихта | <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 | <i>Trametes versicolor</i> IBK 353 |
|------------|--------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Тіамін     | 1,45                                                   | 6,55           | 20,00                                 | 26,90                              |
| Рибофлавін | 1,80                                                   | 2,11           | 49,44                                 | 60,00                              |
| Ніацин     | 19,00                                                  | 5,95           | 43,63                                 | 56,16                              |
| Фолацин    | 0,40                                                   | 3,25           | 67,50                                 | 140,00                             |

Існує така точка зору [25], що при збагаченні харчового продукта додаткове внесення збагачуючого компонента має складати не менше 10 % від норми фізіологічної потреби людини. Наприклад, при створенні вітамінізованого хліба (збагаченого на фолати) необхідно включити в рецептуру 5 % висушеного міцелію *T. versicolor* IBK 353 або 10 % висушеного міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманих при культивуванні на сухарній крихті.

Слід відмітити, що живильне середовище для культивування – сухарна крихта містить тіамін, рибофлавін, ніацин та фолати. Відомо, що внесення вітамінів до живильного середовища може стимулювати продукування лігнолітичних ферментів [26] та посилювати ріст міцелію грибів [27]. Так, внесення тіаміну до живильного середовища призводило до більш інтенсивного синтезу біомаси *S. commune* та *Lentinus subnudus* (Berk) – у 1,8-1,9 разів, а фолатів – до підвищення у 1,7 та 2,6 разів накопичення біомаси *L. subnudus* та *S. commune* відповідно [27].

Показано [16], що на здатність перетворювати поживні речовини субстрату в міцелій значною мірою впливає присутність стимуляторів у живильному середовищі, в першу чергу вітаміну В<sub>1</sub>. Переважна більшість базидієвих грибів не здатна синтезувати певні вітаміни групи В, найчастіше

вітамін В<sub>1</sub> (тіамін), який впливає на синтез та використання вуглеводів [14]. Тому до живильних середовищ при культивуванні базидієвих грибів додають цей вітамін або його попередники [5, 6, 14, 16]. Відомо [8], що до складу борошна хліба, а отже, і до складу сухарної крихти, входить тіамін у кількості від 0,17 мг до 0,42 мг на 100 г в залежності від виду борошна.

## 5.2. Антимікробна активність *Schizophyllum commune* IBK 1768 та *Trametes versicolor* IBK 353

Отримані результати свідчать про те, що водні екстракти міцелію макроміцетів *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353, отриманого при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, виявляли інгібувальну активність (зони просвітлення становили від 7 мм до 9 мм) стосовно досліджуваних видів мікроорганізмів (табл. 5.7).

Найбільшою мірою водні екстракти міцелію *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 пригнічували ріст *Proteus vulgaris* ATCC 6896. Варто відзначити, що антимікробна активність екстрактів міцелію макроміцетів стосовно *Proteus vulgaris* ATCC 6896 наближалась до дії комерційного антибіотику ампіциліну (табл. 5.7).

В іншому дослідженні було встановлено, що водний екстракт міцелію *T. versicolor*, отриманого при глибинному культивуванні на середовищі ГПД, виявив слабку антибактеріальну активність (< 10 мм) до *E. coli*, але, на відміну від даних, отриманих нами, не виявив антимікробної активності до *P. aeruginosa*, та *C. albicans* [28]. При поверхневому культивуванні грибів роду *Trametes* на екстракті солоду, подібно до попереднього дослідження, водні екстракти не утворювали зон пригнічення росту *C. albicans*, а зони пригнічення росту *E. coli* становили від 9,6 мм до 14,3 мм [10]. Водночас, водний екстракт *T. versicolor*, отриманий при глибинному культивуванні на

пивному суслі, сприяв утворенню зон пригнічення: 16,17 мм – *C. albicans*, 19,00 мм – *P. aeruginosa*, 11,25 мм – *E. coli* [3].

Таблиця 5.7

**Антимікробна активність водних екстрактів міцелію лікарських  
макроміцетів при культивуванні на сухарній крихті**

| Екстракт                              | Зона інгібування росту мікроорганізмів, мм |                                    |                                         |                                      |
|---------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|
|                                       | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922         | <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6896  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>Candida albicans</i> ATCC 885-653 |
| <i>Trametes versicolor</i> IBK 353    | 7,2 ± 0,3 a                                | 8,2 ± 0,3 b                        | 6,9 ± 0,4 a                             | 7,1 ± 0,4 a                          |
| <i>Schizophyllum commune</i> IBK 1768 | 7,2 ± 0,3 a                                | 9,2 ± 0,3 c                        | 7,1 ± 0,4 a                             | 8,1 ± 0,4 b                          |
| Стандартні антибіотики для видів      | ампіцилін (10 мкг)<br>19,6 ± 0,6 d         | ампіцилін (10 мкг)<br>10,5 ± 0,3 e | гентаміцин (10 мкг)<br>16,4 ± 0,6 f     | кетоконазол (50 мкг)<br>15,6 ± 0,6 g |

Примітка. Значення з різними літерами статистично відрізняються між собою ( $p < 0,05$ ), всі значення достовірно відрізняються від контролю (відсутність зон інгібування).

Суспензії міцелію *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768, отримані при поверхневому культивуванні на середовищі ГПД, не виявляли антибактеріальної активності до *E. coli* [29]. При поверхневому культивуванні на шроті амаранту *T. versicolor* IBK 353 не проявляла антибактеріальної активності до *E. coli*, а *S. commune* IBK 1768 пригнічувало ріст *E. coli* на 12 мм [29]. Екстракти гарячою водою плодових тіл *S. commune* не виявили антимікробної активності до *E. coli*, *P. vulgaris* та *P. aeruginosa* [30].

Таким чином, аналіз даних літератури та отриманих результатів дають змогу стверджувати, що антимікробна дія *T. versicolor* та *S. commune* є штамозалежною, а також відрізняється в залежності від живильного середовища та екстрагенту. Найбільш наближеною до дії комерційного антибіотику (ампіциліну) серед протестованих нами є антимікробна активність водного екстракту міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманого при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, щодо умовно патогенної грам-негативної бактерії *Proteus vulgaris* ATCC 6896.

### **5.3. Гемаглютинувальна активність *Schizophyllum commune* IBK 1768 та *Trametes versicolor* IBK 353**

Встановлено [31], що лектини лікарських грибів здатні викликати апоптоз у пухлинних клітинах та пришвидшувати мітоз імунокомпетентних клітин, а також мають антимікробну активність [32]. Водночас, вважається [33, 34], що лектини грибів, які склеюють специфічні для чотирьох груп крові вуглеводні детермінанти на поверхні клітин організму людини, можуть негативно впливати на здоров'я, відіграючи роль антиаліментарних факторів харчування при потраплянні в організм людини. Показано, що гемаглютинувальна активність грибних екстрактів залежить від таксономічної належності культур, способу культивування (рідинне, твердофазне) та від складу живильного середовища [35]. При цьому, відмічається [35] значне підвищення лектинової активності при використанні субстратів, несприятливих для росту міцелію, що, ймовірно, має адаптивне значення.

Результати наших досліджень свідчать про те, що екстракти міцелію *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768, одержаних при глибинному



культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, не виявляли гемаглютинувальну активність до еритроцитів чотирьох груп крові людини (табл. 5.8).

Дані літератури стосовно гемаглютинувальної активності лікарських макроміцетів відносяться переважно до вивчення екстрактів плодових тіл різних видів грибів [36]. Зокрема, показано, що екстракти плодових тіл *T. versicolor* не спричинювали аглютинацію еритроцитів чотирьох груп крові людини, на відміну від екстрактів плодових тіл *S. commune*, які викликали аглютинацію без групової селективності [36, 37].

Таблиця 5.8

**Гемаглютинувальна активність міцелію *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 (осадження еритроцитів у мм)**

| Група крові | Контроль (без додавання екстрактів) | Екстракт міцелію <i>T. versicolor</i> <sup>1</sup> | Екстракт міцелію <i>S. commune</i> <sup>1</sup> |
|-------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| I           | 2±1                                 | 3±1                                                | 2±1                                             |
| II          | 2±1                                 | 3±1                                                | 2±1                                             |
| III         | 2±1                                 | 2±1                                                | 2±1                                             |
| IV          | 2±1                                 | 2±1                                                | 2±1                                             |

Примітка. <sup>1</sup> – в стовпчиках значення достовірно не відрізняються від контролю та між собою,  $p < 0,05$ .

Нашими попередніми дослідженнями виявлено, що екстракт міцелію *Ganoderma lucidum* (трутовик лакований), отриманий при поверхневому культивуванні на рідкому середовищі зі шротом амаранту, викликав аглютинування еритроцитів чотирьох груп крові людини [38].

За результатами дослідження хімічного складу біомаси, міцелій *S. commune* IBK 1768 на 4-ту добу глибинного культивування на живильному середовищі з сухарною крихтою містить 18,83 % сирого протеїну, 3,45 %

сирого жиру, 66,06 % вуглеводів (із них 6,79 % ендopolісахаридів), а біомаса *T. versicolor* IBK 353 на 5-ту добу – 19,85 % сирого протеїну, 2,35 % сирого жиру, 62,24 % вуглеводів (із них 6,10 % ендopolісахаридів). Енергетична цінність 100 г висушеної біомаси *T. versicolor* IBK 353 становить 314,38 кКал, а *S. commune* IBK 1768 – 331,89 кКал.

За показниками вмісту незамінних амінокислот, хімічного скору, індексу незамінних амінокислот та прогнозованою біологічною цінністю білок із міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманого при глибинному культивуванні на сухарній крихті, можна вважати білком високої біологічної цінності. Розрахунок амінокислотного скору дав можливість констатувати, що порівняно з вимогами ФАО/ВООЗ біомаса *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353, отримана при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, лімітована за вмістом ізолейцину (79,93 % та 54,23 % відповідно). Індеси незамінних амінокислот *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 становлять 79,22 % та 94,25 %, а прогнозована біологічна цінність – 74,65 % та 91,03 % відповідно.

Фракція жирних кислот біомаси *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 характеризувалась високим вмістом ненасичених жирних кислот (60,45 % та 68,28 % від суми жирних кислот відповідно), найбільший відсоток серед них становили октадеценова та октадекадієнова жирні кислоти.

У біомасі *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768, отриманій при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, а також у сухарній крихті встановлена наявність вітамінів групи В (для міцелію *S. commune* IBK 1768 – вперше), їх сума складала 12,70 мг%, 9,74 мг% та 1,28 мг% відповідно. За розрахунками, 50 г висушеного міцелію зазначених видів лікарських макроміцетів, отриманого при культивуванні на сухарній крихті, може забезпечити від 10 до 70 % добової потреби у досліджених вітамінах.

Водні екстракти міцелію *S. commune* IBK 1768 і *T. versicolor* IBK 353 найбільшою мірою пригнічували ріст *P. vulgaris* ATCC 6896 у порівнянні з *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027 та *C. albicans* ATCC 885-653. Антимікробна дія водного екстракту міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманого при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, щодо умовно патогенної грам-негативної бактерії *Proteus vulgaris* ATCC 6896 виявилась наближеною до дії комерційного антибіотику (ампіциліну).

Екстракти міцелію *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768, одержані при глибинному культивуванні на середовищі з сухарною крихтою, не виявляли гемаглютинувальну активність до еритроцитів чотирьох груп крові людини.

Основні наукові результати розділу опубліковані у працях: [38-45].

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Колодязная В. С. Пищевая химия: Учеб. пособие / В. С. Колодязная. – СПб. : СПбГАХПТ, 1999. – 140 с.
2. Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів: Закон України від 23.12.1997, № 771/97-ВР // Відомості Верховної Ради України. – 1997. – № 19. – Ст. 98.
3. Ковалева, Гульмира Кажгалиевна. Биологические особенности и биохимический состав ксилотрофных базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. и *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat: автореф. дис. ... к.б.н.: 03.00.24 Микология / Ковалева Гульмира Кажгалиевна; [Место защиты: МГУ им. Ломоносова. Биол. фак.]. – Москва, 2009. – 21 с.
4. Krupodorova T. A. Amaranth Flour as a New Alternative Substrate for *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. and *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. Growth / T. A. Krupodorova, V. Yu Barshteyn // Journal of SibFU. Biology. – 2015. – Vol. 8. – P. 32–44.
5. Okwulehie I. C. Pharmaceutical and Nutritional Prospects of Two Wild Macro-Fungi Found in Nigeria / I. C. Okwulehie, C. P. Nwosu, Ch. J. Okoroafor // Biotechnology. – 2007. – Vol. 6, Iss. 4. – P. 567–572.
6. Longvah T. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India / T. Longvah, Y. G. Deosthale // Food Chem. – 1998. – Vol. 63, Iss. 3. – P. 331–334.
7. Антоненко, Лариса Олександрівна. Біотехнологія отримання біомаси вищих базидіальних грибів роду *Coriolus*: автореф. дис ... канд. техн. наук: 03.00.20 / Лариса Олександрівна Антоненко. – Київ, 2013. – 22 с.
8. Mau J.-L. Non-volatile components of several medicinal mushrooms / J. L. Mau, H.-Ch. Lin, Ch.-Ch. Chen // Food Res. Int. – 2001. – Vol. 34. – P. 521–526.

9. Аль-Маалі Г. А. Вплив сульфату та цитрату міді на склад біомаси лікарського гриба *Trametes versicolor* (Polyporales, Polyporaceae) / Г. А. Аль-Маалі, Н. А. Бисько, А. М. Остапчук // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2016. – Т. 1, № 24. – Р. 119–123.
10. Жилинская Наталия Викторовна. Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill: Fr.) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. и *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Lloyd.: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов: дисс. ... к.б.н.: 03.01.06 / Жилинская Наталия Викторовна; [Место защиты: "МГУ им. Ломоносова"], 2015. – 195 с.
11. Aletor V. A. Compositional studies on edible tropical species of mushrooms / V. A. Aletor // Food Chem. –1995. – Vol. 54. – P. 265–268.
12. Elisashvili V. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes / V. Elisashvili, E. Kachlishvili, M. Penninckx // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 35. – P. 1531–1538.
13. Капич А. Н. Содержание и жирнокислотный состав липидов дереворазрушающих базидиомицетов / А. Н. Капич, Е. С. Романовец, С. П. Войт // Микология и фитопатология. – 1990. – Т. 24, № 1. – С. 51–56.
14. Mushrooms as functional foods / [ed. by Cheung P.C.K.]. – New York: Wiley, 2008. – 268 p.
15. Соломко Э. Ф. Пищевая ценность и лекарственные свойства культивируемых базидиальных макромицетов (С. 5-82) / Э. Ф. Соломко, А. С. Бухало, В. Г. Бабицкая, Н. А. Бисько // Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборн. научн. трудов в двух томах. Т. 1 / Под ред. С. П. Вассера. – Киев: Альтерпрес, 2011. – 212 с.

16. Бабицкая В. Г., Щерба В. В., Пучкова Т. А., Бисько Н. А. Биологически активные соединения съедобных и лекарственных грибов (С. 76-344) / Н. А. Бисько, В. Г. Бабицкая, А. С. Бухало [и др.] // Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборн. научн. трудов в двух томах. Т. 2 / Под ред. С. П. Вассера. – Киев, 2012. – 459 с.
17. Mushrooms as functional foods / [ed. by Cheung P.C.K.]. – New York: Wiley, 2008. – 268 p.
18. Amino acid content of foods and biological data on proteins / FAO. Food policy and food science service. Nutrition division. – 1970. – Series: FAO nutritional studies. – Vol. 24: Food and agriculture organization of the United Nations, Rome. – 200 p.
19. Бісько Н. А. Амінокислотний склад продуктів біоконверсії шроту насіння амаранту вищими грибами / Н. А. Бісько, В. Ю. Барштейн, Т. А. Круподьорова, Т. С. Іванова // Проблеми харчування. – 2009. – № 3–4. – С. 53–58.
20. Скурихина И. М. Химический состав пищевых продуктов / И. М. Скурихина // Книга 2. – М.: Агропромиздат, 1987. — 361 с.
21. Crisan E.V., Sands A. Nutritional value / The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms // Ed. by S.T. Chang, W.A. Hayes. – New York: Academic Press, 1978. – P. 137–165.
22. Olennikov D. N. Fatty acid composition of fourteen wood-decaying basidiomycete species growing in permafrost conditions / D. N. Olennikov, S. V. Agafonova, T. A. Penzina // Rec. Nat. Prod. – 2014. – Vol. 8, Iss. 2. – P. 184–188.
23. Дудка И. А. Грибы. Справочник миколога и грибника / И. А. Дудка, С. П. Вассер. – К.: Наукова думка, 1987. – 534 с.
24. Про затвердження Норм фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії: Наказ МОЗ від 03.09.2017, № 1073 // ОВУ. – 2017. – № 87. – Ст. 2658.

25. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»: Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 14.11.2001, № 36 // Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти. – 03.06.2002. – № 22.
26. Adejaye O. D. Physicochemical studies on *Schizophyllum commune* (Fries) a Nigerian edible fungus / O. D. Adejaye, B. C. Adebayo-Tayo, A. A. Ogunjobi, O. O. Afolabi // World Appl. Sci. J. – 2007. – Vol. 2. – P. 73–76.
27. Jonathan S. G. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *Schizophyllum commune* (Fr.: ex. Fr.) from Nigeria / S. G. Jonathan, I. O. Fasidi // Food Chem. – 2001. – Vol. 75. – P. 303–307.
28. Yamac M. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates / M. Yamac, F. Bilgili // Pharm Biol. – 2006. – Vol. 44, Iss. 9. – P. 660–667.
29. Krupodorova T. A. Antibacterial Activity of Macromycetes Mycelia and Culture Liquid / T. A. Krupodorova, V. Yu Barshteyn, E. F. Zabeida, E. V. Pokas // Microbiol. Biotechnol. Lett. – 2016. – Vol. 44. – Iss. 3. – P. 246–253.
30. Mirfat A. H. S. Antimicrobial activities of split gill mushroom *Schizophyllum commune* Fr. / A. H. S. Mirfat, A. Noorlidah, S. Vikineswary // Am. J. Res. Commun. – 2014. – Vol. 2 (7). – P. 113–124.
31. Xu X. Bioactive proteins from mushrooms / X. Xu, H. Yan, J. Chen [et al.] // Biotech. Adv. – 2011. – Vol. 29. – P. 667–674.
32. Рапопорт Е. М. Выделение и характеристика галактозосвязывающих лектинов из сыворотки крови человека / Е. М. Рапопорт, Л. С. Жигис, Е.

- Ю. Корчагина, Т. В. Овчинникова, В. П. Зубов, Н. В. Бовин // Биоорганическая химия. – 1996. – Т. 22, № 5. – С. 353–357.
33. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms / Ed. by S. T. Chang, W. A. Hays. – London: Academic Press, 1978. – 819 p.
  34. Нечаев А. П. Пищевая химия / А. П. Нечаев, С. Е. Траубенберг, А. А. Кочеткова. – СПб.: ГИОРД, 2003. – С. 545.
  35. Ветчинкина Е. П. Активность внутриклеточных лектинов *Lentinus edodes* на разных стадиях развития гриба / Е. П. Ветчинкина, В. Е. Никитина, О. М. Цивилев, Л. Б. Гарибова // Микология и фитопатология. – 2008. – Т. 44. – С. 76–83.
  36. Pemberton R. T. Agglutinins (lectins) from some British higher fungi / R. T. Pemberton // Mycol Res. – 1994. – Vol. 98 (3). – P. 277–290.
  37. Chumkhunthod P. Lectins from Tropical Mushrooms: A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of PhD in Microbiology / Podjana Chumkhunthod. – Nakhon Ratchosima, Thailand, 2004. – 208 p.
  38. Іванова Т. Гемаглютинуюча й антибактеріальна активність лектиновмісної витяжки *Ganoderma lucidum* / Т. Іванова, Г. Мегалінська, Т. Круподьорова // VII Міжнар. наук. конф. студ. і аспір. (5–8 квітня). – Львів. – 2011. – С. 50–51.
  39. Ivanova T. Compositional Study of *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. Grown On the New Substrate Breadcrumb [Електронний ресурс] / Т. Ivanova, L. Titova, G. Megalinska // Наукові доповіді НУБіП України. – 2015. – Т. 57, № 8. Режим доступу: [http://nd.nubip.edu.ua/2015\\_8/16.pdf](http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/16.pdf)
  40. Іванова Т. С. Фізіологічна активність *Schizophyllum commune* та *Trametes versicolor* при культивуванні на сухарній крихті / Т. С. Іванова, Н. А. Бісько, Г. П. Мегалінська // Вісник ОНУ. Серія: Біологія. – 2015. – Т. 20, Вип. 2(37). – С. 83–90.



41. Ivanova T. S. Amino Acid Composition of Medicinal Mushrooms Grown on the Waste of Bread Production/ T. S. Ivanova, G. P. Megalinska, L. O. Antonenko // Biology: from a Molecule up to the Biosphere: VIII International young scient. conf., 3–6 December 2013. – Kharkiv, 2013. – P. 159.
42. Ivanova T. Antimicrobial and cytostatic activity of mushrooms grown on the breadcrumb / T. Ivanova, G. Megalinska, L. Titova // Youth and Progress of Biology: XI International Scient. Conf. for Students and PhD Students, 20-23 April 2015: Book of abstracts. – Lviv, 2015. – P. 342–343.
43. Ivanova T. S. Vitamin content in medicinal mushrooms *Schizophyllum commune* and *Trametes versicolor* cultivated on breadcrumb / T. S. Ivanova, N. A. Bisko, L. O. Titova, G. P. Megalinska // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: IX Междунар. научн. конф., 7-11 сентября 2015г.: тезисы докладов. – Минск, 2015. – С. 154–155.
44. Ivanova T., Megalinska G., Titova L. *Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune* mycelia in submerged cultivation on breadcrumb // Youth and Progress of Biology : XIII International Scientific Conf. for Students and PhD Students, 25-27 April 2017: Book of abstr. – Lviv, 2017. – P. 210–211.
45. Іванова Т. С., Бісько Н. А. Біологічно активні речовини лікарських макроміцетів при культивуванні на продуктах перероблення зернової сировини // Біологія рослин та біотехнологія: Третя конф. молодих учених, 16-18 травня 2017: збірка тез. – Київ, 2017. – С. 68.

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Виявлені лікувальні та харчові властивості макроміцетів обумовлюють виробництво дієтичних добавок, функціональних харчових продуктів, профілактично-лікувальних та косметичних препаратів на основі їх плодових тіл, міцелію та культуральної рідини [1]. Для більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів живильного середовища становить близько 20-30 % загальних витрат на виробництво [2], тому актуальним є пошук нових субстратів для культивування лікарських макроміцетів, дешевих, доступних та безпечних за складом.

Україна має великий потенціал сільськогосподарських угідь, (54-59) % загальної посівної площі яких засіяно зерновими культурами [3]. Традиційно важливою частиною виробництва харчових продуктів у нашій країні є виробництво хліба та хлібобулочних виробів. Відносно новими та прогресивними галузями виробництва, особливо важливими в наш час, є альтернативні джерела енергії, зокрема біоетанол, який в Україні виробляється з кукурудзи, сорго та бурякової меляси. Кожне виробництво має певний спектр відходів, які доцільно з економічної та екологічної точки зору переробляти на проміжні продукти, що мають подальше застосування.

На рис. 6.1 зображена загальна схема роботи та послідовність етапів її виконання. Першим етапом нашої роботи був підбір видів та штамів із колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК) макроміцетів, що за даними літератури мають лікувальні властивості та добре ростуть на різних живильних середовищах. В результаті такого пошуку було обрано 10 видів грибів із відділів *Basidiomycota* та *Ascomycota*, що належать до 2 класів (*Agaricomycetes* та *Sordariomycetes* відповідно), 3 порядків, 8 родин, 8 родів.



Рис. 6.1. Схема основних етапів роботи

Для обраних видів лікарських грибів як біологічних агентів за даними літератури характерна виражена імуномодельовальна та протипухлинна активність, зокрема,  $\beta$ -глюкани та полісахарид-протеїнові комплекси *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor* та *Schizophyllum commune* пройшли клінічні дослідження як протиракові препарати. Крім того, для обраних грибів показана антибактеріальна, протівірусна, гепатопротекторна,

антидіабетична, кардіологічна дія, зниження рівня холестерину, покращення функціонального стану певних органів та систем органів (зокрема, нервової, статеві), лікування й профілактика хронічних захворювань [4]. *Ganoderma lucidum* є модельним лікарським грибом [5], а *S. commune* – модельним грибом для генетичних досліджень [6]. Серед обраних видів грибів є їстівні види, що мають досліджену харчову цінність (*Flammulina velutipes* та *Pleurotus ostreatus*). Хоча на основі деяких із обраних грибів створені функціональні продукти харчування та дієтичні добавки (*L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *T. versicolor* й *P. ostreatus*), використання нових для культивування міцелію субстратів потребує дослідження біохімічних властивостей видів лікарських грибів.

При збиранні грибів у природі грибники стикаються з такими основними проблемами: складнощі у точному визначенні систематичного положення; забрудненість навколишнього середовища токсинами, важкими металами, радіонуклідами, які гриби мають здатність сорбувати; у різних умовах хімічний склад та харчова цінність грибів можуть значно варіювати. При штучному культивуванні можливо уникнути цих проблем, використовуючи чисті культури грибів та незабруднені субстрати відомого складу. При глибинному культивуванні на рідких живильних середовищах можливо значно скоротити термін культивування [7].

На другому етапі роботи ми підбирали можливі субстрати для культивування макроміцетів (відходи перероблення зернових культур) та визначали їх склад. Серед знайдених субстратів виявилися такі: багаса сорго та барда кукурудзи – відходи виробництва біоетанолу, аспіраційні відходи ячменю – відходи виробництва пива, відходи III-ої категорії з млина – відходи виробництва борошна, а також сухарна крихта – відходи виробництва хліба. Всі відходи виявилися добре підсушеними (вологість від 8 % до 10 %), що сприяє їх зберіганню. Зольність відходів становила до 10 %. Багаса сорго, сухарна крихта та відходи млина мали низький вміст білку (від

9 % до 12 %), аспіраційні відходи ячменю – 27 %, барда кукурудзи – 35 %. Барда кукурудзи вирізнялась також високим вмістом сирого жиру (13 %) та низьким вмістом вуглеводів (36 %). Інші субстрати мали незначний вміст жиру (від 0,5 % до 1,1 %) та високий вміст вуглеводів (від 57 % до 78 %). Значення рН живильного середовища на основі барди кукурудзи після автоклавування складало  $4,5 \pm 0,1$ , на основі багаси сорго –  $4,6 \pm 0,1$ , а для інших досліджуваних субстратів –  $6,0 \pm 0,5$ .

В результаті проведеного скринінгу 10-ти видів лікарських макроміцетів на 5-ти субстратах (продуктах перероблення зернової сировини) виявилось, що сухарна крихта призводила до накопичення максимальної біомаси 4-ма видами грибів (*S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900), які були обрані для подальших досліджень при культивуванні на цьому субстраті. Ефективність сухарної крихти як субстрату для культивування макроміцетів можна пояснити високим вмістом легкодоступних вуглеводів, вітамінів групи В, здатністю розварюватись при автоклавуванні (що сприяє розчиненню вуглеводів у товщі води при поверхневому культивуванні). Живильне середовище для культивування грибів, що містить відходи виробництва харчових продуктів та воду (де використовується сухарна крихта суміші хлібів або з окремого сорту хліба як відходи виробництва харчових продуктів) при співвідношенні компонентів від 25 г до 60 г сухарної крихти на 1 дм<sup>3</sup> води було нами запатентоване [8].

Барда кукурудзи та багаса сорго найменше сприяли накопиченню біомаси досліджуваних видів грибів. Причиною цього, можливо, був низький рівень рН у порівнянні з іншими субстратами (4,5-4,6).

Для порівняння зі скринінгом при культивуванні макроміцетів на сухарній крихті суміші хлібів із пшеничного та житнього борошна проводили скринінг на сухарних крихтах окремих видів хліба: «Хліба українського столичного», «Хліба білоруського» та «Батона нарізного київського» ПАТ

«Київхліб» (м.Київ). Загалом, максимальна та мінімальна концентрація біомаси макроміцетів суттєво не відрізнялася (в межах  $0,6 \text{ г/дм}^3$ ) при культивуванні на живильних середовищах з різних видів сухарної крихти. На всіх видах сухарної крихти добре росли два види роду *Ganoderma*, а найгірше росли *L. edodes* IBK 502 та *G. frondosa* IBK 976.

Наступним етапом був підбір оптимальної концентрації сухарної крихти при глибинному культивуванні *S. commune* IBK 1768, *T. versicolor* IBK 353, *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900. Виявилося, що *S. commune* IBK 1768, який найкраще ріс на цьому субстраті, мав найвищу ефективність біоконверсії при  $60 \text{ г/дм}^3$ , для інших грибів чим менше біомаси накопичував макроміцет на живильному середовищі з сухарною крихтою під час скринінгу, тим менша концентрація сухарної крихти була для нього оптимальною. При підвищенні концентрації субстрату вище оптимальної ефективність біоконверсії зменшувалась, хоча біомаса ще продовжувала трохи зростати, проте із граму субстрату вже утворювалось менше біомаси, ніж при оптимальній концентрації. В результаті цього дослідження ми обрали концентрації сухарної крихти, які не були інгібувальними для утворення біомаси:  $40 \text{ г/дм}^3$  для *G. lucidum* IBK 1900,  $50 \text{ г/дм}^3$  для *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353, а також  $60 \text{ г/дм}^3$  для *S. commune* IBK 1768.

Підібравши оптимальні концентрації сухарної крихти для видів грибів, що найкраще ростуть на цьому субстраті, перед нами постало завдання з'ясувати, на яку добу макроміцети накопичують максимальну біомасу при таких концентраціях субстрату в глибинній культурі. Результати дослідження показали, що на середовищі з сухарною крихтою підібраної концентрації найбільшу біомасу *S. commune* IBK 1768 накопичував на 3-тю добу культивування ( $21,1 \pm 0,5$ )  $\text{г/дм}^3$ , *T. versicolor* IBK 353 – на 5-ту добу ( $15,8 \pm 0,5$ )  $\text{г/дм}^3$ , *F. velutipes* IBK 1878 – на 7-му добу ( $14,0 \pm 0,4$ )  $\text{г/дм}^3$ , а *G. lucidum* IBK 1900 – на 14-ту добу ( $16,9 \text{ г/дм}^3 \pm 0,5 \text{ г/дм}^3$ ). При максимальних значеннях біомаси спостерігались мінімальні значення рН.

При глибинному культивуванні *G. lucidum* IBK 1900 на сухарній ми спостерігали диауксію, двохфазний ріст, що потребувало подальшого вивчення.

Динаміка глибинного культивування *G. lucidum* IBK 1900 на різноманітних субстратах добре досліджена [9-14], крім цього, нас зацікавило викривлення кривої накопичення біомаси, яке може свідчити про двохфазний ріст (диауксію), тому для цього гриба ми додатково вивчали у динаміці концентрації органічних кислот та редукувальних речовин у культуральній рідині. Динаміка концентрації органічних кислот у культуральній рідині *G. lucidum* IBK 1900 при ферментуванні сухарної крихти показала, що зниження рН, скоріше за все якраз пов'язане із накопиченням органічних кислот, що спостерігалось при культивуванні міцелію макроміцетів на інших живильних середовищах [15]. Динаміка концентрації редукувальних речовин у культуральній рідині *G. lucidum* IBK 1900 підтвердила, що ми спостерігали явище диауксії, оскільки крива мала два піки.

Серед чотирьох лікарських макроміцетів, що добре росли на сухарній крихті в поверхневій культурі, за динаміками глибинного культивування на оптимізованій за концентрацією сухарній крихті ми обрали два види, що накопичували найбільшу біомасу за найкоротші проміжки часу – *S. commune* IBK 1768 (21 г/дм<sup>3</sup> за 3 доби) та *T. versicolor* IBK 353 (16 г/дм<sup>3</sup> за 5 діб). Так як попередню динаміку глибинного культивування на сухарній крихті проводили на 3-тю, 5-ту, 7-му, 10-ту, 12-ту та 14-ту добу, то нас цікавило, на яку саме добу спостерігалися піки накопичення біомаси. Тому для *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 ми відбирали біомасу щодобово (2-га, 3-тя, 4-та, 5-та доба для *S. commune* IBK 1768 та 3-тя, 4-та, 5-та, 6-та доба для *T. versicolor* IBK 353). У біомасі *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353 щодобово визначали накопичення сирого протеїну та ендополісахаридів. Встановлено, що культивування *S. commune* IBK 1768 протягом 4 діб та *T. versicolor* IBK 353 протягом 5 діб сприяє ефективній

утилізації сухарної крихти та максимальному біосинтезу сирого протеїну й ендополісахаридів. На 4-ту добу культивування *S. commune* накопичувало 24 г/дм<sup>3</sup> біомаси із 7 % ендополісахаридів та 19 % сирого протеїну; *T. versicolor* на 5-ту добу накопичувала 16 г/дм<sup>3</sup> біомаси із 6 % ендополісахаридів та 20 % сирого протеїну. Вищезазначені терміни культивування були обрані для отримання цільового продукту – біомаси лікарських макроміцетів та детальнього аналізу вмісту біологічно активних речовин.

У міцелії *S. commune* IBK 1768 (при періоді культивування 4 доби та концентрації субстрату 60 г/дм<sup>3</sup>) та у міцелії *T. versicolor* IBK 353 (при терміні культивування 5 діб та концентрації субстрату 50 г/дм<sup>3</sup>), отриманому при глибинному культивуванні на сухарній крихті, висушеному при 60 °C та подрібненому, визначали харчову цінність – вологість, зольність, вміст сирого жиру, білку, загальний вміст вуглеводів, а також енергетичну цінність. Крім цього, досліджували амінокислотний, жирнокислотний профіль, вміст вітамінів групи В, так як за літературними даними макроміцети можуть мати високий відсоток незамінних амінокислот, ненасичених жирних кислот та є хорошим джерелом вітамінів групи В, а також оскільки ці речовини є одними з основних, що визначають біологічну цінність харчових продуктів.

Міцелій грибів мав вологість від 10 % до 12 %, вміст сирого жиру від 2 % до 3 % а.с.р., сирого протеїну від 19 % до 20 % а.с.р., вуглеводів від 62 % до 66 %. Зольність міцелію макроміцетів відрізнялася більше, ніж вдвічі (1,42 % а.с.р. для *S. commune* IBK 1768 та 3,31 % а.с.р. для *T. versicolor* IBK 353). Розрахунок енергетичної цінності показав, що 100 г сировини міцелію грибів становить близько 16-17 % потреби у енергії при добовому раціоні харчування 2000 кКал.

За показниками вмісту незамінних амінокислот, хімічного скору, індексу незамінних амінокислот та прогнозованою біологічною цінністю білок із міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманого при глибинному



культивуванні на сухарній крихті, можна вважати білком високої біологічної цінності. Вміст ненасичених жирних кислот був вищим у міцелії *S. commune* IBK 1768 (68,28 %) і *T. versicolor* IBK 353 (60,45 %), ніж вміст насичених. Міцелій відібраних видів лікарських грибів мав більш високий вміст незамінних амінокислот та більш високий вміст вітамінів у порівнянні з субстратом, проте відсоток ненасичених жирних кислот був досить високим у сухарній крихті (67,18 %).

При добовій порції 50 г, висушений міцелій *S. commune* IBK 1768 і *T. versicolor* IBK 353, отриманий при культивуванні на сухарній крихті, може забезпечити від 10 до 70 % добової потреби у таких вітамінах як: тіамін, рибофлавін, ніацин та фолати. При створенні вітамінізованого хліба (який буде вважатися збагаченим на фолати) необхідно включити в рецептуру 5 % висушеного міцелію *T. versicolor* IBK 353 або 10 % висушеного міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманих при культивуванні на сухарній крихті.

Завершальним етапом роботи було визначення актимікробної та гемаглютинувальної активності екстрактів міцелію грибів. Водні екстракти *S. commune* IBK 1768 і *T. versicolor* IBK 353 пригнічували ріст умовно патогенних мікроорганізмів *Escherihia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653 і найбільшою мірою – *Proteus vulgaris* ATCC 6896. Вважається [16], що лектини грибів, які склеюють специфічні для чотирьох груп крові вуглеводні детермінанти на поверхні клітин організму людини, можуть негативно впливати на здоров'я. Екстракти міцелію *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768, одержаних при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, не виявляли гемаглютинувальну активність до еритроцитів чотирьох груп крові людини, тобто не мають такого негативного впливу.

На рис. 6.2 зображена схема глибинного культивування макроміцетів. Вона включає приготування глибинно культивованого посівного матеріалу

для уникнення лаг-фази. Як посівний матеріал використовували міцелій в експоненційній фазі росту, культивований в таких же умовах і на живильних середовищах такого ж складу, як і в подальшому експерименті.



Рис. 6.2. Схема процесу глибинного культивування лікарських макроміцетів на живильному середовищі з сухарною крихтою

Розроблена схема глибинного культивування макроміцетів (рис. 6.2) та аналіз даних літератури [17] дозволяють класифікувати наведений у роботі біотехнологічний процес:

- ✓ за характеристикою біологічного агента – клітини еукаріот;

- ✓ за числом біологічних агентів – один (чиста культура продуцента);
- ✓ за умовами проведення процесу – стерильний, аеробний, глибинний, періодичний, рідинний, багатоступеневий;
- ✓ за стадією реалізації технології виробництва – 4-та стадія (виділення, очищення, сушіння);
- ✓ за цільовим продуктом – клітинна біомаса, що містить комплекс біологічно активних речовин;
- ✓ за механізмом утворення кінцевого продукту – біосинтез.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mushrooms as functional foods / [ed. by Cheung P.C.K.]. – New York: Wiley, 2008. – 268 p.
2. Підгорський В. С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу: монографія / В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська, Т. П. Пирог; НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – К.: Наук. думка, 2010. – 328 с.
3. Статистичний збірник України. Україна у цифрах 2015 / За ред. І. М. Жук. – К.: Державна служба статистики України, 2016. – 239 с.
4. Wasser S. P. Medicinal Properties of Substances Occuring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review) / S. P. Wasser, A. L. Weis // Int. J. Med. Mushrooms. – 1999. – Vol.1. – P. 31–62.
5. Qian J. Genome-wide analysis of simple sequence repeats in the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* / J. Qian, H. Xu, J. Song [et al.] // Gene. – 2013. – Vol. 512, Iss. 2. – P. 331–336.
6. Ohm R. A. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune* / R. A. Ohm, J. F. Jong, L. G. Lugones [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2010. – Vol. 28, № 9. – P. 957–965.
7. Wasser S. P. Dietary Supplements from Medicinal Mushrooms: Diversity of Types and Variety of Regulations / S. P. Wasser, E. Nevo, D. Sokolov [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. – 2000. – Vol.2. – P.1–19.
8. Іванова Т.С., Бісько Н.А., Циганков С.П., Новак А.Г. Поживне середовище для культивування грибів // Патент України на корисну модель № 98224. Заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Бюл. № 8 від 27.04.2015р., заявка u 2014 10934, МПК A01G 1/04 (2006. 01).
9. Papinutti L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma*

- lucidum* complex / L. Papinutti // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 1941–1946.
10. Xu P. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media / P. Xu, Zh.-Y. Ding, Zh. Qian [et. al.] // Enzyme Microb. Technol. – 2008. – Vol. 42. – P. 325–331.
  11. Круподьорова Т.А. Біологічні особливості *Ganoderma applanatum* (Perst.:Wallr.) Pat. та *G. lucidum* (Curtis:Fr.) P.Karst. в культурі: автореф. дис. ... к.б.н.: 03.00.21/ Круподьорова Тетяна Анатоліївна; Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. – К., 2009. – 21 с.
  12. Lee H. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics / H. Lee, M. Song, Y. Yu, S. Hwang // Biochem. Eng. J. – 2003. – Vol. 15. – P. 93–99.
  13. Fang Q.-H. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* / Q.-H. Fang, J.-J. Zhong // Process Biochem. – 2002. – Vol. 37. – P. 769–774.
  14. Смирнов Д.А. Углеводы глубинной культуры *Ganoderma lucidum*: образование, характеристика: автореф. дис. ... к.б.н.: 03.00.07 / Смирнов Денис Алексеевич; Институт микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2007. – 23 с.
  15. Elisashvili V. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocess and Products (Review) / V. Elisashvili // Int. J. Med. Mushrooms. – 2012. – Vol. 14. – Iss. 3. – P. 211-239.
  16. Crisan E.V., Sands A. Nutritional value / The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms // Ed. by S.T. Chang, W.A. Hayes. – New York: Academic Press, 1978. – P. 137–165.
  17. Елинов Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – СПб: Наука, 1995. – С. 230-231.

## ВИСНОВКИ

Вивчено закономірності впливу живильних середовищ з відходами перероблення зернових культур на утворення біомаси лікарськими макроміцетами, досліджено особливості глибинного культивування відібраних видів грибів на живильному середовищі з сухарною крихтою, підібрано оптимальні концентрації субстрату для максимальної ефективності біоконверсії та розроблено спосіб приготування глибинно культивованого посівного матеріалу для уникнення лаг-фази, а також проаналізовано якісний та кількісний склад біомаси *S. commune* IBK 1768 і *T. versicolor* IBK 353 при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою.

1. В результаті скринінгу 10-ти видів лікарських макроміцетів при поверхневому культивуванні на живильних середовищах із 5-ма новими субстратами – відходами перероблення зернових культур – виявлено, що *O. sinensis* IBK 1928, *G. applanatum* IBK 1701, *G. frondosa* IBK 976, *L. edodes* IBK 502 та *P. ostreatus* IBK 551 накопичують найбільшу біомасу на аспіраційних відходах ячменю (від 3,17 г/дм<sup>3</sup> до 6,19 г/дм<sup>3</sup>), а *C. militaris* IBK 1862, *G. lucidum* IBK 1900, *F. velutipes* IBK 1878, *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768 – на сухарній крихті (від 5,12 г/дм<sup>3</sup> до 8,99 г/дм<sup>3</sup>).

2. Відповідно до показників максимальної ефективності біоконверсії субстрату, при глибинному культивуванні *G. lucidum* IBK 1900 оптимальна концентрація сухарної крихти становила 40 г/дм<sup>3</sup>, *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353 – 50 г/дм<sup>3</sup>, а для *S. commune* IBK 1768 – 60 г/дм<sup>3</sup>.

3. Серед досліджуваних субстратів для культивування міцелію макроміцетів було обрано сухарну крихту, що забезпечувала найвищі показники концентрації біомаси (до 24 г/дм<sup>3</sup>). Продемонстровано, що максимальну біомасу на середовищі з сухарною крихтою при глибинному культивуванні накопичували *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768. Глибинний спосіб вирощування міцелію відібраних видів грибів дозволив

вдвічі скоротити час культивування в порівнянні з поверхневим. Встановлена оптимальна тривалість культивування для отримання максимальних показників накопичення біомаси, синтезу білків та ендopolісахаридів, а також ефективності біоконверсії субстрату: 4 доби для *S. commune* IBK 1768 та 5 діб для *T. versicolor* IBK 353. При цьому, штам *S. commune* IBK 1768 синтезував 24 г/дм<sup>3</sup> біомаси із 7 % ендopolісахаридів та 19 % сирого протеїну, а *T. versicolor* IBK 353 – 16 г/дм<sup>3</sup> біомаси із 6 % ендopolісахаридів та 20 % сирого протеїну.

4. За показниками хімічного скору (79,93 %), індексу незамінних амінокислот (94,25 %) та прогнозованої біологічної цінності (91,03 %) білка із міцелію *S. commune* IBK 1768, отриманого при глибинному культивуванні на сухарній крихті, він може вважатися білком високої біологічної цінності. В жирнокислотному профілі міцелію *S. commune* IBK 1768 і *T. versicolor* IBK 353 превалювали ненасичені жирні кислоти (68,28 % та 60,45 % відповідно). Міцелій вищезазначених видів грибів містив вітаміни: тіамін, рибофлавін, ніацин та фолати. Сумарний вміст перерахованих вітамінів становив 9,74 мг% для *S. commune* IBK 1768 та 12,70 мг% для *T. versicolor* IBK 353. Розрахована енергетична цінність міцелію макроміцетів при глибинному культивуванні на сухарній крихті: 331,89 кКал на 100 г висушеної біомаси *S. commune* IBK 1768 та 314,38 кКал на 100 г висушеної біомаси *T. versicolor* IBK 353.

5. Встановлено, що водні екстракти міцелію *S. commune* IBK 1768 і *T. versicolor* IBK 353 пригнічували ріст *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 885-653 (зона інгібування росту 6,9-8,1 мм) і найбільшою мірою – *P. vulgaris* ATCC 6896 (до 9,2 мм). Екстракти міцелію *T. versicolor* IBK 353 та *S. commune* IBK 1768, одержаних при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, не виявляли гемаглютинувальну активність до еритроцитів чотирьох груп крові людини.

## **Додаток А**



## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Іванова Т. С.**, Круподьорова Т. А., Барштейн В. Ю., Мегалінська Г. П. Скринінг лікарських грибів при культивуванні на відходах харчової промисловості України // Науковий часопис НПУ імені М. П. Драгоманова. Серія 20. Біологія. – 2012. – №4. – С. 113–119. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, постановка експериментальної частини, участь у написанні статті*)
2. **Іванова Т. С.**, Бісько Н. А., Круподьорова Т. А., Барштейн В. Ю. Особливості глибинного культивування *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. на хлібній крихті // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2012. – №3 (хімічні і біологічні науки і технології). – С. 30–35. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментальної частини, написання статті*)
3. **Ivanova T. S.**, Bisko N. A., Krupodorova T. A., Barshteyn V. Yu. Breadcrumb as a new substrate for *Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune* submerged cultivation // Korean J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol.42. – Iss.1. – P. 67–72. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, розроблена схема досліджень разом із науковим керівником, постановка експериментальної частини, написання статті*)
4. **Ivanova T.**, Titova L., Megalinska G. Compositional study of *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. grown on the new substrate breadcrumb [Електронний ресурс] // Наукові доповіді НУБіП України. – 2015. – № 8 (57). Режим доступу: [http://nd.nubip.edu.ua/2015\\_8/16.pdf](http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/16.pdf) (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних даних; глибинне культивування та підготування зразків міцелію для дослідження амінокислотного, жирнокислотного та вітамінного складу; визначення вологості,*

зольності, вмісту сирого протеїну, сирого жиру, вуглеводів та енергетичної цінності міцелію; написання статті)

5. **Іванова Т. С., Бісько Н. А., Мегалінська Г. П.** Фізіологічна активність *Schizophyllum commune* та *Trametes versicolor* при культивуванні на сухарній крихті // Вісник ОНУ. Біологія. – 2015. – Т. 20, Вип. 2 (37). – С. 83–90. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних даних, розроблена схема досліджень та сформульовані висновки разом зі співавторами, постановка експериментальної частини, написання статті)

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

6. **Іванова Т. С., Бісько Н. А., Барштейн В. Ю., Круподьорова Т. А.** Біологічно активні речовини грибів відділу *Basidiomycota* (Огляд) // Проблеми харчування. – 2010. – №1–2(22). – С. 42–47. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, написання статті)
7. **Ivanova T. S., Krupodorova T. A., Barshteyn V. Yu., Artamonova A. B., Shlyakhovenko V. A.** Anticancer substances of mushroom origin // Exp. Oncol. – 2014. – Vol.36. – Iss.1. – P. 1–9. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, написання статті)
8. **Іванова Т.С., Бісько Н.А., Циганков С.П., Новак А.Г.** Поживне середовище для культивування грибів // Пат. України на корисну модель № 98224. Заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Бюл. № 8 від 27.04.2015р., заявка u 2014 10934, МПК A01G 1/04 (2006. 01). (Особистий внесок здобувача: ідея проведення дослідження, патентний пошук, розроблена схема досліджень разом із науковим керівником, постановка експериментальної частини, написання формули, реферату та опису до патенту)

Тези конференцій:

9. **Іванова Т.**, Мегалінська Г., Круподьорова Т. Гемаглютинуюча й антибактеріальна активність лектиновмісної витяжки *Ganoderma lucidum* // Молодь і поступ біології : збірн. тез VII Міжнар. наук. конф. студ. і аспір., 5 - 8 квітня 2011 р. – Львів, 2011. – С. 50–51. (*Постерна доповідь*).
10. Бисько Н. А., **Іванова Т. С.**, Барштейн В. Ю., Круподьорова Т. А., Антоненко Л. А., Мегалінська Г. П. Скринінг лікарських грибів для культивування на відходах харчової промисловості // Біотехнологія XXI століття : тези допов. V регіональної наук.-практ. конф. викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів, 26 квітня 2011 р. – Київ, 2011. – С. 59. (*Усна доповідь*).
11. **Іванова Т. С.**, Бисько Н. А., Барштейн В. Ю., Круподерова Т. А., Антоненко Л. А., Мегалинская А. П. Скрининг базидиомицетов – продуцентов ценных биологически активных веществ при культивировании на растительных отходах пищевой промышленности // Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения : тезисы докл. Научн.-практ. конф., 23-28 мая 2011 г. – Крым, Новый Свет, 2011. – С. 363. (*Постерна доповідь*).
12. **Іванова Т. С.**, Круподьорова Т. А. Біохімічні особливості глибинного культивування лікарського бізидіоміцета *Ganoderma lucium* (CURTIS) P. KARST // Ukr. Biochem. J. – Київ. – 2011. – Т. 83. – № 4. – С. 141. (*Усна доповідь*).
13. **Іванова Т. С.**, Антоненко Л. А., Мегалінська А. П. Культивування лікарських грибів на субстраті з хлібної крихти в якості основи для створення функціональних продуктів // Біологія растений и біотехнологія : I конф. молод. учен. : сборн. тезисов, 5-7 октября 2011 г. – Белая Церковь, 2011. – С. 99. (*Усна доповідь*).
14. **Ivanova T. S.**, Megalinska G. P., Antonenko L. O. Amino acid composition of medicinal mushrooms grown on the waste of bread production // Biology: from

- a Molecule up to the Biosphere : Abstr. of the VIII International young scient. conf., 3-6 December 2013. – Kharkiv, 2013. – P. 159–160. (*Заочна участь*).
15. **Ivanova T. S.** Mushrooms as a component of functional foods // Plant Biology and Biotechnology : Abstr. Book of 2-nd Conf. of Young Scient., 23-24 December 2013.–Kyiv, 2013. – P. 76. (*Усна доповідь*).
  16. **Іванова Т. С.**, Титова Л. А., Мегалинская А. П. Утилизация продуктов переработки зернового сырья лекарственными грибами // Актуальные проблемы биоэкологии : Материалы Междунар. научн. конф., 23-25 октября 2014 г. – Минск, 2014. – С. 80–81. (*Заочна участь*).
  17. **Ivanova T.**, Megalinska G., Titova L. Antimicrobial and cytostatic activity of mushrooms grown on the breadcrumb // Youth and Progress of Biology: XI International Scient. Conf. for Students and PhD Students, 20-23 April 2015 : Book of abstr. – Lviv, 2015. – P. 342–343. (*Заочна участь*).
  18. **Іванова Т. С.**, Тітова Л. О., Мегалінська Г. П. Сухарна крихта як субстрат для культивування лікарських грибів // Біотехнологія ХХІ століття: ІХ Всеукр. наук.-практ. конф., 24 квітня 2015 р. : тези допов. – К., 2015. – С. 43. (*Усна доповідь*).
  19. **Ivanova T. S.**, Bisko N. A., Titova L. O., Megalinska G. P. Vitamin content in medicinal mushrooms *Schizophyllum commune* and *Trametes versicolor* cultivated on breadcrumb // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: ІХ Междунар. научн. конф., 7-11 сентября 2015г. : тезисы докл. – Минск, 2015. – С. 154–155. (*Заочна участь*).
  20. **Ivanova T.**, Bisko N., Titova L., Megalinska G. Submerged cultivation of medicinal mushroom mycelia on the breadcrumb // Molecular Microbiology and Biotechnology : Abstr. of International scientific conf. (Odessa, 21-23 June 2016). – Odessa, 2016. – P. 17. (*Заочна участь*).
  21. **Ivanova T.S.**, Bisko N.A., Titova L.O., Tsugankov S.P. Utilization of bioethanol by-products in processis of Macromycetes cultivation // Current Problems of Biology and Ecology : Materials of International Scientific and

- Practical Conf. (Vinnytsia, 3-7 October 2016). – Vinnytsia, 2016. – P. 115–117. (*Заочна участь*).
22. **Ivanova T.**, Megalinska G., Titova L. *Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune* mycelia in submerged cultivation on breadcrumb // Youth and Progress of Biology : XIII International Scientific Conf. for Students and PhD Students, 25-27 April 2017 : Book of abstr. – Lviv, 2017. – P. 210–211. (*Усна доповідь*).
23. **Іванова Т. С.**, Бісько Н. А. Біологічно активні речовини лікарських макроміцетів при культивуванні на продуктах перероблення зернової сировини // Біологія рослин та біотехнологія : Третя конф. молодих учених, 16-18 травня 2017 : збірка тез. – Київ, 2017. – С. 68. (*Усна доповідь*).

## **Додаток Б**



**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”**

**ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ**

03056, Київ-56, проспект Перемоги, 37 тел.: 204-94-52, 204-83-12, тел.fax: 204-82-13  
e-mail: [biotech@kpi.ua](mailto:biotech@kpi.ua)

№ 3300/2-12  
Від “23” 01 2018 р.

**Акт**

**впровадження матеріалів дисертаційної роботи у навчальний процес**

Матеріали дисертаційної роботи «Біотехнологія культивування лікарських макроміцетів на відходах перероблення зернових культур» провідного інженера лабораторії біотехнології біопалив та інновацій в зеленій енергетиці Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» Іванової Тетяни Сергіївни впроваджено у навчальний процес на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського. Матеріали дисертаційної роботи будуть використані в лабораторній роботі за темою «Переробка відходів сільського господарства з використанням біотехнології» при підготовці до перевидання методичних вказівок до виконання лабораторних робіт кредитного модуля «Біотехнологія сільськогосподарських виробництв» дисципліни «Проектування та виробництво біотехнологічної продукції».

Декан ФБТ

Зав. кафедри промислової  
біотехнології



О.М. Дуган

Т.С. Тодосійчук

## **ТЕМА 2. ПЕРЕРОБКА ВІДХОДІВ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА З ВИКОРИСТАННЯМ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2**

#### **Переробка відходів рослинництва з метою отримання кормового білку (2 заняття)**

**Мета роботи:** ознайомлення з методами біодеструкції лігноцелюлозних відходів агропромислового комплексу (безпосередньо сільського господарства, переробної промисловості та лісового господарства) та набуття навичок виділення та аналізу кормового білку, отриманого шляхом культивування базидієвих грибів.

#### **Короткі теоретичні відомості**

Відходи – будь-які речовини, матеріали і предмети, що утворилися у процесі виробництва чи споживання, а також товари (продукція), що повністю або частково втратили свої споживчі властивості і не мають подальшого використання за місцем їх утворення чи виявлення і від яких їх власник позбувається, має намір або повинен позбутися шляхом утилізації чи видалення.

Операції поводження з відходами включають збирання, перевезення, зберігання, сортування, оброблення (перероблення), утилізацію, видалення, знешкодження і захоронення відходів. Утилізація відходів – використання відходів як вторинних матеріальних чи енергетичних ресурсів.

Одним з масових видів відходів є рослинні, лігноцелюлозні відходи. До рослинних відходів належать відходи виробництва продукції сільського та лісового господарства, відходи виробництва харчових продуктів та напоїв, виробництва деревини, одягу, паперу тощо. Зокрема, це:



- рослинні відходи сільського господарства — компоненти сільсько-господарських культур (солома, бадилля овочевого, качани кукурудзи тощо);
- відходи виробництва деревини (тирса деревних порід, деревна стружка та обрізки тощо);
- відходи виробництва харчових продуктів та напоїв (лушпиння соняшника, лузга і висівки зернових культур, аспіраційні відходи ячменю, сухарна крихта, молочна сироватка, барда кукурудзи та меляси тощо).

Лігноцелюлозні відходи, що з'являються в результаті виробництва продукції сільського та лісового господарства, виробництва продуктів харчових, паперу та інших галузей промисловості є важкодоступними для швидкого мікробного розкладання в природних умовах, тому накопичуються у великих кількостях, забруднюють навколишнє середовище і являють серйозну екологічну проблему. В зв'язку з цим, останніми роками інтенсивно розробляються нові напрями біотехнології переробки лігноцелюлозних відходів, при цьому велика увага приділяється дереворуйнівним базидієвим грибам. Відомо, що ці гриби мають ефективну ферментну систему, за допомогою якої розкладають полісахаридні і лігнінові компоненти субстрату. Крім того, що біоконверсія рослинних відходів призводить до отримання гумусових речовин, які забезпечують родючість ґрунту, використання їстівних грибів дає змогу виробляти білкову кормову масу. В результаті біодеструкції субстрати трансформуються в біомасу з підвищеною біологічною, поживною та енергетичною цінністю, високим вмістом амінокислот, вітамінів, мінеральних речовин, мікроелементів і білка.

Грибами, що можуть використовуватися для проведення біоконверсії рослинних відходів є їстівні лігнотрофні базидіоміцети, які переважно належать до порядків *Polyporales* та *Agaricales*, мають або гарні поживні та смакові якості (*Pleurotus ostreatus* (глива), *Lentinula edodes* (шіітаке), *Grifola*

*frondosa* (грифола кучерява), *Flammulina velutipes* (опеньок зимовий), *Laetiporus sulphureus* (трутовик сірчано-жовтий) тощо, або біомаса яких може бути джерелом сполук з лікувально-профілактичними властивостями (*Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Polyporus squamosus*, *Ganoderma lucidum* тощо).

Незалежно від того, з якою метою проводиться культивування, штами повинні характеризуватися високою швидкістю росту міцелію, значною конкурентоспроможністю до сторонньої мікрофлори, здатністю утилізувати лігноцелюлозні субстрати та можливістю використання субстрату після збору плодових тіл грибів в якості корму для тварин або добрив, чи бути сировиною для отримання біологічно активних речовин.

Для вирощування може бути застосовано соломку пшениці, жита, ячменя, качани й стебла кукурудзи, лушпиння соняшникового насіння, тирсу листяних порід дерев, тощо. Крім того, для підвищення живильних властивостей субстрату до нього додають патоку, висівки, ошурки, а також, для підвищення якості плодових тіл грибів, відповідні домішки мінеральних солей калію, натрію, кальцію, фосфору, тощо.

При проведенні твердофазного культивування базидіоміцетів контролюється температура, вологість, освітлення та відсутність контамінації.

Практичне значення та умови культивування для різних видів лігнотрофних базидіоміцетів наводяться нижче.

### *Grifola frondosa*

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання глюканів та глюкано-протеїнових комплексів (грифолан, грифрон) з протипухлинною, імуномодулюючою, холестеринзнижуючою, гепато-протекторною, та ін. дією.

Основою субстратів є тирса листяних порід дерев – бук, дуб, клен, в'яз, рідше – вільха, тополя, а також лушпиння соняшника, солома. До

основи зазвичай додають висівки, борошно, розчини солей, гіпс, тощо. Умови, при яких проводиться культивування, залежать від стадії росту базидіоміцета – нарощення міцелію: +21-24°C, 95-100% вологість, в темряві; формування примордій: +10-15,6°C, 95% вологість, освітлення; розвиток плодових тіл: +13-16°C, вологість 75-85%, освітлення.

#### *Laetiporus sulphureus*

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання ксанто-каротинів, лектинів, тощо.

В якості субстрату використовується суміш тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, з додаванням зерна, висівок, крейди, гіпсу. Умови нарощення міцелію: +25-28 °C, 65-75 % вологість, в темряві; розвиток плодових тіл: +18-21 °C, вологість 90-95 %, освітлення.

#### *Lentinula edodes*

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання глюкану (лентинан) з протипухлинною, імуномодулюючою, тощо дією.

В якості субстрату використовується суміш тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, з додаванням зерна, висівок, крейди, гіпсу. Умови нарощення міцелію: +25-28 °C, 65-75 % вологість, в темряві; розвиток плодових тіл: +13-16 °C (холодолюбні штами), +18-21 °C (теплолюбні штами), вологість 90-95 %, освітлення.

#### *Pleurotus ostreatus*

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання харчового білку.

Умови нарощення міцелію: +24-28 °C, 95-100 % вологість, в темряві; розвиток плодових тіл: +14-18 °C, вологість 75-85 %, освітлення. Для деяких

штамів для формування примордій необхідним є проведення холодового шоку (+0-2°C) протягом 1-2 доби.

*Polyporus squamosus*

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання харчового білку.

В якості субстрату використовується суміш тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, з додаванням зерна, висівок, крейди, гіпсу. Умови нарощення міцелію: +25-28 °C, 65-75 % вологість, в темряві; розвиток плодових тіл: +18-21 °C, вологість 90-95 %, освітлення.

*Schizophyllum commune*

Умовно їстівний (плодові тіла жорсткі, проте вживаються в їжу в тропічних країнах), неотруйний. Джерело отримання глюкану (шизофілан) з протипухлинною, імуномодулюючою, гепатопротекторною, протизапальною тощо дією.

Для культивування використовуються різноманітні субстрати. Оскільки є термофілом та ксерофітом, то кращими умовами є +35-37 °C та вологість 60-70 %.

*Trametes (Coriolus) versicolor*

Неїстівний, неотруйний. Джерело отримання пептидоглюканів (крестин (PSK) та PSP) та полісахариду коріолану.

Сумарно препарати з *Trametes versicolor* мають наступні лікувальні властивості: антивірусну, антибактеріальну, гепатопротекторну, імуномодулюючу, протипухлинну.

Умови нарощування міцелію: температура інкубації +24-29 °C, відносна вологість 90-100 %, тривалість процесу 14-21 доба, в темряві; розвиток плодових тіл +18-24 °C, відносна вологість 95 %, освітлення.

### *Ganoderma lucidum*

Неїстівний, неотруйний. Джерело отримання терпеноїдів, імуномодельовальних білків, полісахаридів. Підвищує імунітет, має антибактеріальну, протівірусну, протипухлинну активність, покращує діяльність серцево-судинної, видільної, статеві, нервової та дихальної систем організму.

В якості субстрату використовується букова та дубова тирса, солома, з додаванням борошна кукурудзи, висівки, крейди, гіпсу. Умови вирощування міцелію: +30 °C, 90-95 % вологість, в темряві; розвиток плодових тіл: +20-25 °C, вологість 80-95 %, освітлення.

### **Хід роботи**

#### **Підготовчі роботи. Отримання посівного міцелію культур вищих базидіальних грибів**

З пробірки з культурою на агаризованому середовищі асептично гачком в колбу з стерильним рідким поживним середовищем маленькими шматочками переносять міцелій. Як рідке поживне середовище для культивування міцелію можна використовувати сухарну крихту з концентрацією 50 г на дм<sup>3</sup> води, барду м'яси чи молочну сироватку. Ці поживні середовища містять легкодоступні вуглеводи та необхідні вітаміни, є легкодоступними та дешевими відходами. Колби залишають при +27-28°C на 2-3 доби потім переставляють на качалку з оптимальними для даного виду частотою перемішування та температурою. Вирощування посівного матеріалу триває до 7-ми діб.

#### **Заняття 1. Інокуляція рослинних субстратів культурами вищих базидіальних лігнотрофів**

З добре перемішаного простерилізованого субстрату відбирається 30 г та залишається для подальших досліджень. Основна маса субстрату шарами

засипається в ємність, яку попередньо було оброблено дезінфектантом (етанол 70%, розчин хлору, тощо), перемежуючи невеликими кількостями посівної біомаси певного базидіоміцету. Після чого ємність ставиться в термостат при температурі, оптимальній для даного виду (штаму). Культивування здійснюється до повного заростання субстрату.

## **Заняття 2. Перевірка ефективності біоконверсії рослинних субстратів**

Дослідження вмісту білку та вільних амінокислот проводиться в завчасно відібраному вихідному субстраті та в грибній біомасі з субстратом після біоконверсії. При цьому обов'язково визначається (ваговим методом – висушуванням при  $+105\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) та враховується вологість.

### Визначення вмісту білку.

Наважку 2 г подрібнюють ножицями або ножом в ступку, додають 10 мл 0,5 М NaOH, добре перемішують, кількісно переносять в пробірку та кип'ятять 15 хвилин на водяній бані. Охолоджують, фільтрують через паперовий фільтр, відбирають фільтрат для визначення білку.

Для визначення білку використовують метод Лоурі. Для цього в пробірку наливають 0,4 мл досліджуваного розчину, додають 2 мл реактиву III (50 мл розчину I (2% розчин карбонату натрію, приготований на 0,1н NaOH) + 1 мл розчину II (0,5% розчин  $\text{CuSO}_4$ , приготований на 1% розчині цитрату натрію)) та залишають при кімнатній температурі на 10 хв. Після чого доливають 0,2 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу (перед застосуванням розводиться водою дистильованою (1 : 1), перемішують та залишають на 30 хвилин. Через 30 хвилин вимірюють оптичну густину при 750 нм в кюветі 10 мм.

Концентрацію білку визначають за калібрувальним графіком, побудованим в межах 10-200 мг/мл білку.

### Визначення вмісту вільних амінокислот.

Наважку 1 г подрібнюють ножицями або ножом в ступку, додають 10 мл 75% розчину етилового спирту, нагрітого на водяній бані до  $T=+60-70^{\circ}\text{C}$ . Суміш старанно розтирають протягом 2-3 хв, додають ще 10 мл етанолу та фільтрують через складчастий паперовий фільтр у чашку для випарювання. Після цього на киплячій водяній бані з фільтрату повністю випарюють спирт. До отриманого сухого залишку додають 1 мл р-ну  $\text{HCl}$  і старанно розтирають скляною паличкою протягом 2-3 хв. З чашки кислотний р-н амінокислот кількісно переносять у стакан на 100 мл. Для цього ополіскують чашку дистильованою водою, порціями по 6 мл, доводячи загальний об'єм екстракту до 25 мл. До суміші амінокислот у стакані додають 1г  $\text{BaCl}_2$  і перемішують 2 хвилини. Доводять водою об'єм до 100 мл і при наявності осаду, фільтрують крізь складчастий паперовий фільтр від фосфорнокислих і вуглекислих солей барію. Готують дві колби на 100 мл. У одну вливають 20 мл фільтрату, в другу – 20 мл дист.води та по 10 крапель р-ну фенолфталеїну і по 10 мл формольної суміші і титрують з бюретки розчином  $\text{NaOH}$  0,05 М до появи ледь помітного рожевого забарвлення. Кольори контролю і проби повинні бути однаковими. Масову концентрацію амінокислот (мг/г) обчислюють за формулою:

$$C = \frac{(A - B) \cdot f \cdot q}{V},$$

де: А, В - об'єми  $\text{NaOH}$ , витрачені на титрування проби і контролю (мл); f- коефіцієнт поправки на титр  $\text{NaOH}$ ; q - концентрація  $\text{NaOH}$  (мг/мл); V - об'єм р-ну АК, взятого на аналіз (мл).

Враховують вологість досліджуваного матеріалу.

### Результати досліджень обрахувати та навести короткі висновки.

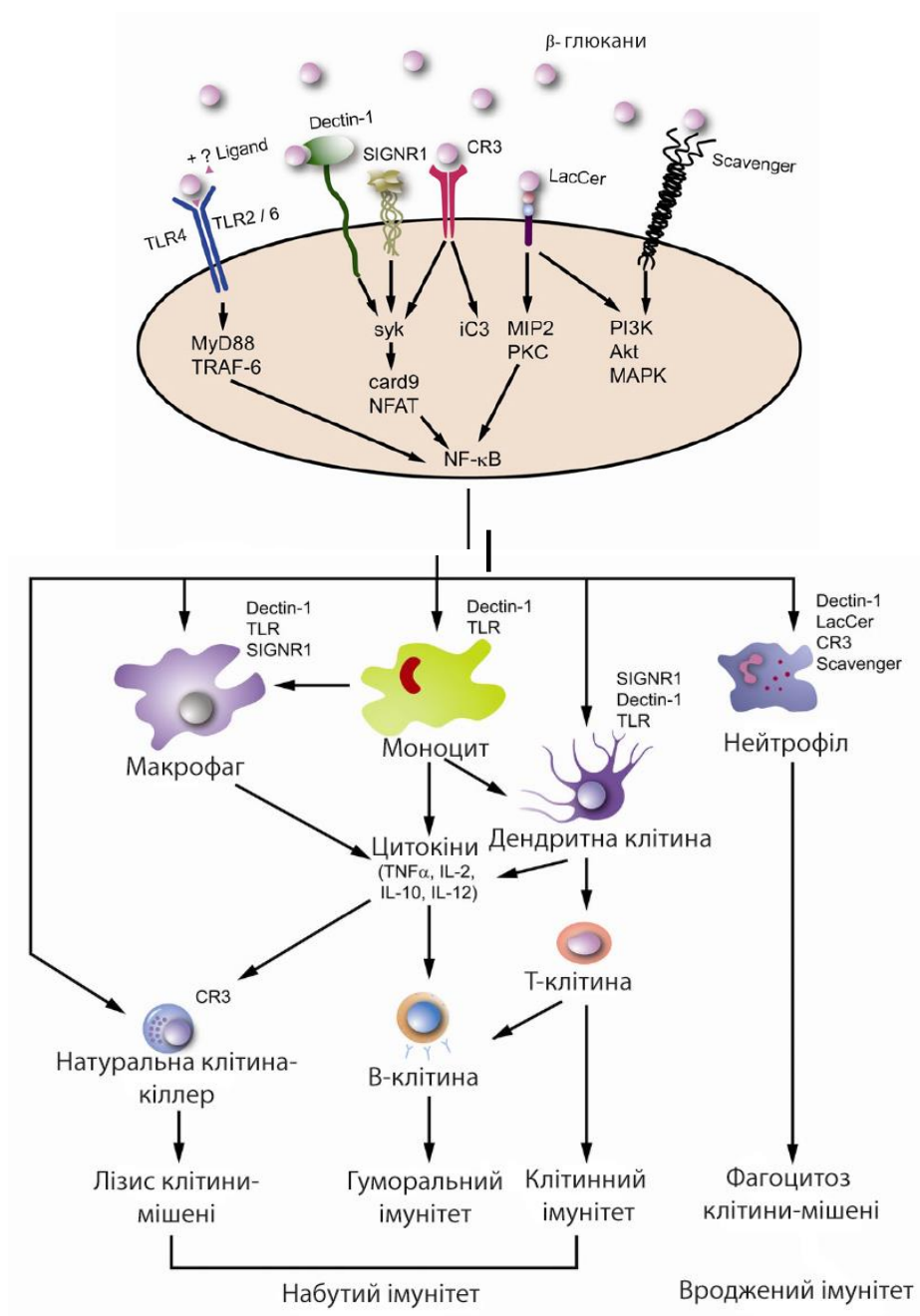
### **Контрольні питання.**

1. Що таке відходи?
2. Наведіть приклади виробництв, в результаті яких утворюються рослинні відходи.
3. Чому важливо утилізувати лігноцелюлозні відходи?
4. В чому переваги використання для біоконверсії рослинних відходів лігнотрофних вищих базидіоміцетів?
5. Які продукти можна отримати в результаті біоконверсії рослинних відходів лігнотрофними базидіальними грибами?
6. Наведіть умови отримання посівного матеріалу базидіоміцетів на відходах рослинного походження.
7. Які рідкі поживні середовища можна використовувати для приготування посівного міцелію культур вищих базидіальних грибів?
8. Наведіть умови проведення твердофазного культивування базидіоміцетів на відходах рослинного походження.
9. Які процеси відбуваються при біоконверсії лігноцелюлозних відходів вищими лігнотрофними базидіоміцетами?

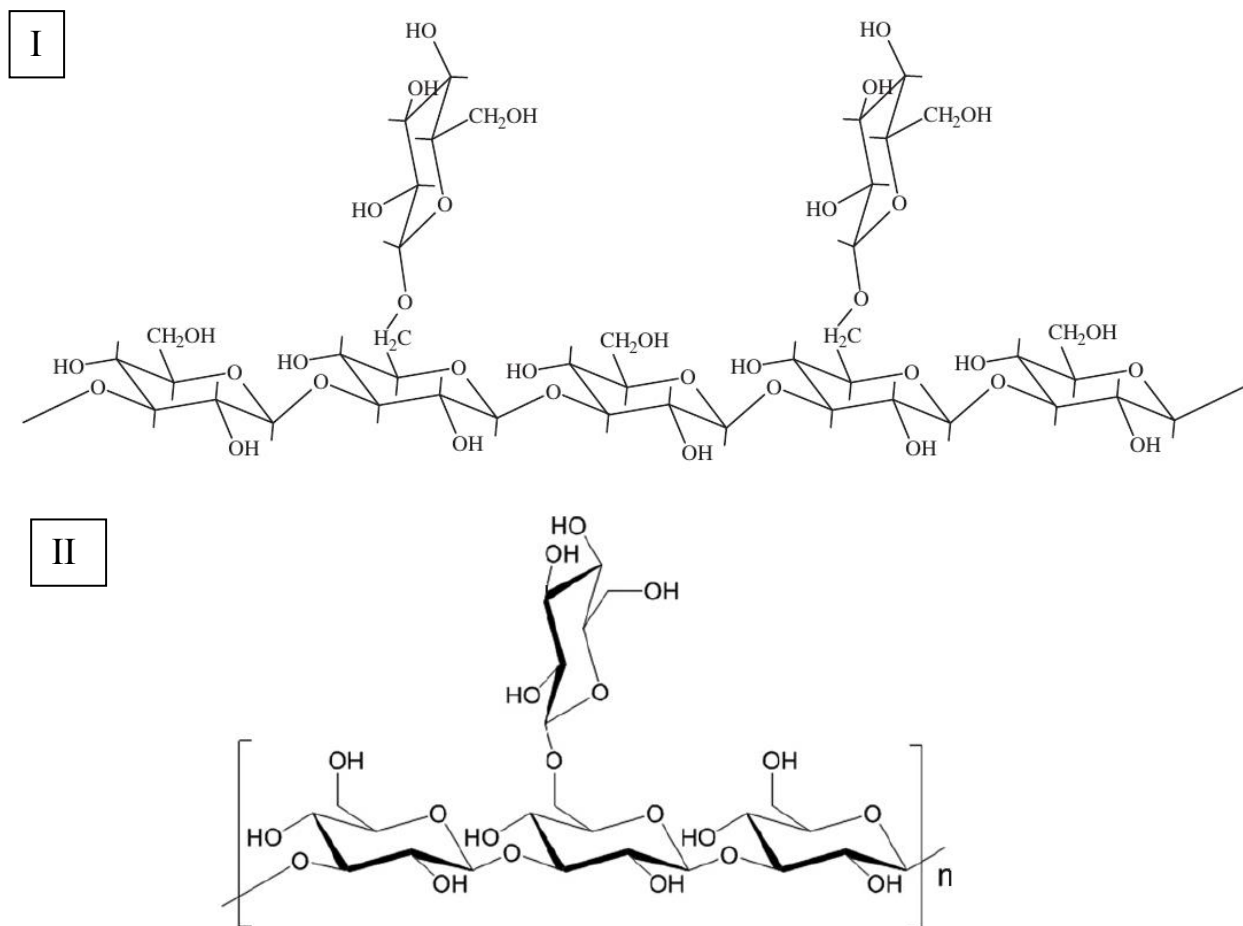


## Додаток В

Схема імунної відповіді, індукованої  $\beta$ -глюканами макроміцетів [8 в розд. I].  $\beta$ -глюкани та їх комбінації з лігандами взаємодіють із мембранними рецепторами імунних клітин. В результаті каскаду реакцій залучаються вроджений та набутий імунітет



## Додаток Г

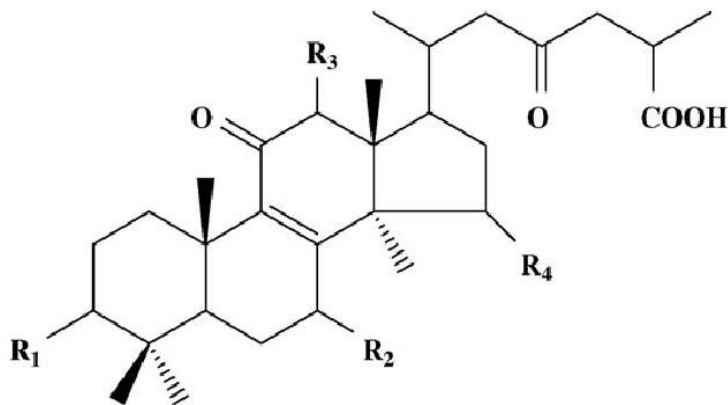
Структурні формули біологічно активних  $\beta$ -глюканів макроміцетів

I – повторюваний фрагмент структурної формули лентинану, виділеного із плодових тіл *L. edodes* [12 в розд. I];

II – повторюваний фрагмент структурної формули шизофілану, виділеного із культуральної рідини *S. commune* [13 в розд. I].

## Додаток Д

Структурні формули деяких ганодерових кислот із *G. lucidum* [38 в розд.1]



ганодерова кислота C<sub>2</sub>: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=β-OH, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=α-OH;

ганодерова кислота В: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=β-OH, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=O;

ганодерова кислота АМ<sub>1</sub>: R<sub>1</sub>= β-OH, R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub>=O, R<sub>3</sub>=H;

ганодерова кислота К: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=β-OH, R<sub>3</sub>= β-OAC, R<sub>4</sub>=O;

ганодерова кислота Н: R<sub>1</sub>= β-OH, R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub>=O, R<sub>3</sub>= β-OAC;

ганодерова кислота D: R<sub>1</sub>= R<sub>4</sub>=O; R<sub>2</sub>=β-OH, R<sub>3</sub>=H.

## Додаток Ж

Схематичне зображення клітинної стінки макроміцетів та її компонентів [11  
в розд. І]



## Додаток 3

Таблиця 1

**Відходи та проміжні продукти переробної промисловості як інгредієнти рідких живильних середовищ для культивування міцелію макроміцетів**

| № п/п | Субстрат/<br>живильне<br>середовище         | Види макроміцетів                                                                                                                                                                                                                    | Джерело<br>в<br>розділі I                                            |
|-------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1     | Молочна та<br>підсирна<br>сироватка         | <i>Ganoderma applanatum</i><br><i>Ganoderma lucidum</i><br><i>Pleurotus sajor-caju</i><br><i>Phellinus linteus</i><br><i>Hericium erinaceus</i><br><i>Lentinula edodes</i><br><i>Grifola umbellata</i><br><i>Trametes versicolor</i> | [49]<br>[49, 50]<br>[51]<br>[52]<br>[53]<br>[54]<br>[55]<br>[56, 57] |
| 2     | Відхід<br>виробництва<br>крохмалю           | <i>G. applanatum</i><br><i>G. lucidum</i>                                                                                                                                                                                            | [50]                                                                 |
| 3     | Пивне сусло                                 | <i>T. versicolor</i><br><i>L. edodes</i><br><i>Schizophyllum commune</i><br><i>Grifola frondosa</i>                                                                                                                                  | [57]<br>[58]<br>[59]<br>[59]                                         |
| 4     | Меляса                                      | <i>S. commune</i><br><i>G. frondosa</i><br><i>Cordyceps jiangxiensis</i><br><i>Phanerochaete chrysosporium</i>                                                                                                                       | [59]<br>[59]<br>[60]<br>[61]                                         |
| 5     | Арахісова<br>шкаралупа                      | <i>Inonotus obliquus</i>                                                                                                                                                                                                             | [62]                                                                 |
| 6     | Лушпиння<br>соняшника                       | <i>Pleurotus ostreatus</i>                                                                                                                                                                                                           | [63]                                                                 |
| 7     | Відходи<br>виробництва<br>соєвого<br>молока | <i>Volvariella bombycina</i> , <i>Lyophyllum<br/>ulmarium</i> , <i>Pleurotus citrinopileatus</i>                                                                                                                                     | [64]                                                                 |
| 8     | Післяспиртова<br>барда пшениці              | <i>Cerrena unicolor</i> , <i>Fomes fomentarius</i> ,<br><i>Funalia trogii</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>Pseudotremella<br/>gibbosa</i>                                                                                              | [65]                                                                 |
| 9     | Солома<br>пшениці                           | Ті ж, що і в № 8<br>Ко-культивування <i>Irpex lacteus</i> та<br><i>S. commune</i>                                                                                                                                                    | [65]<br>[66]                                                         |

Продовж. табл. 1

| №<br>п/п | Субстрат/<br>живильне<br>середовище                                                                    | Види макроміцетів                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Джерело<br>в<br>розділі І |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 10       | Мандаринові<br>шкірки                                                                                  | Ті ж, що в № 8 + <i>Bjerkandera adusta</i> ,<br><i>G. applanatum</i> , <i>L. edodes</i> , <i>Lenzites</i><br><i>warnieri</i> , <i>Pleurotus dryinus</i> , <i>Postia</i><br><i>tephroleuca</i> , <i>Pycnoporus coccineus</i> ,<br><i>Trametes ochracea</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>Cerrena</i><br><i>maxima</i> , <i>Ganoderma adspersum</i> ,<br><i>G. lucidum</i> , <i>Hypsizygus marmoreus</i> ,<br><i>Omphalotus olearius</i> , <i>Pycnoporus</i><br><i>cinnabarinus</i> , <i>Phlebia radiata</i> , <i>Phellinus</i><br><i>robustus</i> , <i>Trametes hirsuta</i> , <i>Trametes zonata</i> | [65, 67]                  |
| 11       | Бананові<br>шкірки                                                                                     | <i>G. lucidum</i><br>Рекомбінантний штам <i>Coprinopsis cinerea</i><br>з трансгенними промоторами целюлази із<br><i>Agaricus bisporus</i> , <i>Flammulina velutipes</i> та<br><i>L. edodes</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | [67]<br>[68]              |
| 12       | Пшеничні<br>висівки                                                                                    | Ті ж, що і в № 10<br><i>Agaricus blazei</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | [65, 67]<br>[68]          |
| 13       | Висівки<br>кукурудзи, сої,<br>пір'я курки                                                              | <i>G. lucidum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | [69]                      |
| 14       | Виноградні<br>вичавки                                                                                  | Ті ж, що і в п. № 8<br><i>L. edodes</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | [65]<br>[70]              |
| 15       | Відходи<br>виробництва<br>макаронних<br>продуктів,<br>какао-вела,<br>шрот амаранту,<br>ехінацеї, хмелю | <i>F. velutipes</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>S. commune</i> ,<br><i>G. frondosa</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. lucidum</i> ,<br><i>F. fomentarius</i> , <i>Phellinus igniarius</i> ,<br><i>Inonotus obliquus</i> , <i>T. versicolor</i> ,<br><i>H. erinaceum</i> , <i>Piptoporus betulinus</i> ,<br><i>L. edodes</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Coprinus</i><br><i>comatus</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Cordyceps</i><br><i>militaris</i>                                                                                                                                  | [71, 72]                  |
| 16       | Шрот сої                                                                                               | <i>Cordyceps jiangxiensis</i><br><i>P. ostreatus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | [73]<br>[74]              |
| 17       | Шрот<br>кукурудзи,<br>арахісу                                                                          | <i>C. jiangxiensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | [73]                      |

Продовж. табл. 1

| №<br>п/п | Субстрат/<br>живильне<br>середовище                                                         | Види макроміцетів                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Джерело<br>в<br>розділі I |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 18       | Гідролізат<br>лузги рису                                                                    | <i>S. commune</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [75]                      |
| 19       | Вичавки<br>помідорів                                                                        | <i>T. versicolor</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | [76]                      |
| 20       | Мелені роги<br>барана                                                                       | <i>A. bisporus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | [77]                      |
| 21       | Шкірки яблука,<br>листя дерев                                                               | <i>L. edodes</i> , <i>Pleurotus dryinus</i> , <i>P. ostreatus</i> ,<br><i>Pleurotus tuber-regium</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | [78]                      |
| 22       | Вичавки яблук,<br>відходи кави,<br>шкаралупа<br>какао-бобів,<br>крихти вафлі та<br>тістечок | <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Clitopilus<br/>passeckerianus</i> , <i>Hypholoma capnoides</i> ,<br><i>Kuehneromyces mutabilis</i> , <i>L. edodes</i> ,<br><i>Marasmius cohortalis</i> , <i>Nidula<br/>niveotomentosa</i> , <i>Paecilomyces farinosus</i> ,<br><i>Pleurotus eous</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>Polyporus<br/>melanopus</i> , <i>Postia caesia</i> , <i>Trametes<br/>suaveolens</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>Tyromyces<br/>chioneus</i> , <i>Clitocybe lignatilis</i> , <i>Cyathus<br/>helenae</i> , <i>Ischnoderma benzoinum</i> ,<br><i>L. sulphureus</i> , <i>Lentinus squarrosulus</i> ,<br><i>Mycetinis scorodonius</i> , <i>Panellus serotinus</i> ,<br><i>P. chrysosporium</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>Pleurotus<br/>sapidus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> ,<br><i>Wolfiporia cocos</i> | [79]                      |