

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

Іванова Тетяна Сергіївна



УДК 582.284+582.282: 577.1:664.76

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

03.00.20 – біотехнологія

**Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

КИЇВ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Державній установі «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Бісько Ніна Анатоліївна,
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України,
провідний науковий співробітник відділу мікології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Поєдинок Наталія Леонідівна,
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», старший науковий співробітник відділу клітинної біології і біотехнології

кандидат біологічних наук, доцент

Бойко Ольга Анатоліївна,
Національний університет біоресурсів і природокористування України МОН України, завідувач кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

Захист відбудеться «15» червня 2018р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 у Державній установі «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, тел./факс: (044) 343 37 77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розісланий «14» травня 2018р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н.



Г. Я. Баєр

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Макроміцети – це гриби з макроскопічними плодовими тілами, їх використовують як цінний харчовий продукт та як джерело одержання природних фармакологічних речовин з протипухлинними, імуномодельючими, протизапальними, антимікробними, антидіабетичними та іншими лікувальними властивостями [Moradali et al., 2007; Rathore et al., 2017; Muszyńska et al., 2018; Soković et al., 2018]. 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 [Elisashvili, 2012], 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 [Meng et al., 2016], лектини з *G. frondosa* [Степанова и др., 2007] та *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler [Ветчинкина и др., 2008], терпеноїди з *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. [Gu et al., 2017] та *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. [Wang et al., 2006].

Для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів живильного середовища становить близько 20-30 % від загальних витрат на виробництво [Підгорський та ін., 2010]. 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 [Підгорський та ін., 2010]. Зернові культури та продукти їх перероблення широко використовуються для культивування макроміцетів [Barshteyn et al., 2016], 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 [Жук, 2016].

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, ендополісахаридів 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 Стьюдента 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/дм³) та *T. versicolor* IBK 353 (15,8 г/дм³) 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 B 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/дм³, 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 сухою 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'яниковою (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 вчених «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 XXI 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В огляді даних літератури охарактеризовано основні класи біологічно активних речовин лікарських макроміцетів, їх хімічну будову, властивості та застосування. Приділено увагу полісахаридам та полісахарид-протеїновим комплексам, що пройшли клінічні дослідження як протипухлинні засоби. Вказано перелік субстратів та живильних середовищ на основі відходів та проміжних продуктів переробної промисловості для культивування міцелію макроміцетів. Обговорюється зв'язок між складом живильних середовищ та утворенням окремих біологічно активних речовин, а також характер біоконверсії субстратів макроміцетами. Розглядається біотехнологічне застосування лікарських макроміцетів для створення дієтичних добавок, новітніх харчових інгредієнтів, протиракових вакцин, наночастинок благородних металів, напівпровідникових нанокристалів, косметичних засобів, а також для очищення стічних вод.

Матеріали та методи досліджень

Штами макроміцетів отримані з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (ІВК) [Бухало та ін., 2011], відомі як продуценти харчової біомаси та біологічно активних речовин (табл. 1).

Субстратами для поверхневого культивування досліджуваних видів грибів були: відходи млина зернових культур III-ої категорії надані ПрАТ «Київмлин» (м. Київ), аспіраційні відходи ячменю – ПАТ «Оболонь» (м. Київ), сухарна крихта – ПАТ «Київхліб» (м. Київ), барда кукурудзи – ДП «Немирівський спиртовий завод» (Вінницька обл., м. Немирів) та багаса сорго – ТОВ «Компанія «Еко-Енергія» (Сумська обл., Лебединський р-н, с. Будилка). Всі досліди з культивування макроміцетів та визначення хімічного складу субстратів проводили на одній партії кожного з відходів

виробництва підприємств. Для порівняння із 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).

Таблиця 1

Систематичне положення макроміцетів, використаних в роботі

Порядок	Родина	Вид	Штам
Відділ <i>Ascomycota</i>			
Клас <i>Sordariomycetes</i>			
<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Cordyceps militaris</i> (L.) Link	1862
	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	<i>Ophiocordyceps sinensis</i> (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora	1928
Відділ <i>Basidiomycota</i>			
Клас <i>Agaricomycetes</i>			
<i>Agaricales</i>	<i>Physalacriaceae</i>	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	1878
	<i>Pleurotaceae</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	551
	<i>Schizophyllaceae</i>	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	1768
<i>Polyporales</i>	<i>Fomitopsidaceae</i>	<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray	976
	<i>Ganodermataceae</i>	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	1701
		<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	1900
	<i>Polyporaceae</i>	<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	353
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler		502	

Міцелій грибів вирощували поверхневим способом у колбах об'ємом 0,1 дм³ із концентрацією субстратів 25 г/дм³. В умовах глибинної культури досліди проводили у колбах на качалці при 120 об./хв. Інокулюм вносили в кількості 10 % (об'ємних).

Вологість визначали за ГОСТ 29143-91, зольність – за ДСТУ ISO 2171:2009, вміст загального Нітрогену – за методом К'ельдаля [Плешков, 1985] з модифікаціями. Для встановлення вмісту сирого протеїну перераховували кількість загального Нітрогену з використанням коефіцієнту 4,38 для біомаси грибів [Cheung, 2008] та 5,7 – для субстратів [Нечаев и др., 2007]. Вміст сирого жиру досліджували екстрагуванням петролейним ефіром (для біомаси грибів) та гексаном (для субстратів) у апараті Сокслет [ГОСТ 29033-91, 2004]. Вміст вуглеводів (%) розраховували за формулою [Liu et al., 2012]. Енергетичну цінність визначали за стандартною методикою [Cheung, 2008]. Вміст ендopolісахаридів у біомасі оцінювали ваговим методом [Chihara et al., 1970]. У культуральній рідині визначали концентрацію органічних кислот [Валуйко, 1980] та редукувальних речовин [Тодоров, 1968]. рН культуральної рідини досліджували потенціометричним методом. Для визначення швидкості росту продуценту, ефективності біоконверсії субстрату, швидкості утворення сирого протеїну та ендopolісахаридів, а також продуктивності процесу їх біосинтезу користувалися формулами [Бабицкая и др., 2012; Wu et al., 2003].

Аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили за методикою [Christie, 1989] на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert (Agilent technologies, США). Ступінь ненасиченості ліпідів визначали за формулою [Бабицкая и др., 2012]. Амінокислотний склад білків досліджували на амінокислотному аналізаторі (“Mikrotechna”, Чехія). Хімічний критерій амінокислот (скор), індекс незамінних амінокислот, прогнозовану біологічну цінність та індекс поживності розраховували за формулами [FAO, 1970; Crisan et al., 1978]. Дослідження вмісту тіаміну (вітамін В₁) та фолатів (вітамін В₉) проводили вимірюванням флюоресценції окиснених вітамінів [Островский, 1979; Григорьева и др., 1969], вмісту рибофлавіну (вітамін В₂) – з використанням рибофлавін зв’язувального апопротеїну з курячих яєць [Коденцова и др., 1994], вмісту ніацину (вітамін В₃) – методом гідролізу та колориметричного визначення забарвленого похідного глютаконового альдегіду [Степанова, 1963].

Для визначення гемаглютинувальної активності вимірювали ступінь осадження еритроцитів (мм) при добавлянні лектиновмісної витяжки міцелію макроміцетів до крові людини чотирьох груп [Луцик, 1981]. Антимікробну активність водних екстрактів міцелію перевіряли методом паперових дисків щодо *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 ATCC 25922, *Proteus vulgaris* Hauser, 1885 ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter 1872, Migula 1900 ATCC 9027 та *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 ATCC 885-653 з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України [Подгорский и др., 2007]. Як негативний контроль для визначення антимікробної дії екстрактів міцелію використовували екстракт сухарної крихти, як позитивний контроль – стандартні антибіотики [Katircioglu et al., 2006].

Кількісні результати, що були отримані у проведених експериментах, оброблено статистичними методами аналізу, виконано розрахунки середнього арифметичного та довірчих інтервалів за допомогою комп’ютерної програми Microsoft Excel 2010. Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно t-критерієм Стьюдента при 5 %-му рівні значущості у програмі OriginPro 8.5.1.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати хімічного аналізу субстратів для культивування лікарських макроміцетів показали (рис. 1), що основним компонентом є вуглеводи (57-78 %), за винятком барди кукурудзи, де сирий протеїн і вуглеводи знаходились приблизно на однаковому рівні ($34,69 \pm 3,50$ % 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 %. 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 – $6,0 \pm 0,5$.

На барді кукурудзи досліджені види макроміцетів утворювали від $0,21$ г/дм³ до $2,35$ г/дм³ а.с.р. біомаси (рис. 2), цей субстрат виявився таким, що найменше сприяє

накопиченню біомаси. 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 та *T. versicolor* IBK 353. На мелених відходах з млина III-ої категорії гриби нарощували біомасу на 19-50 % більше в порівнянні із цілими (рис. 2).

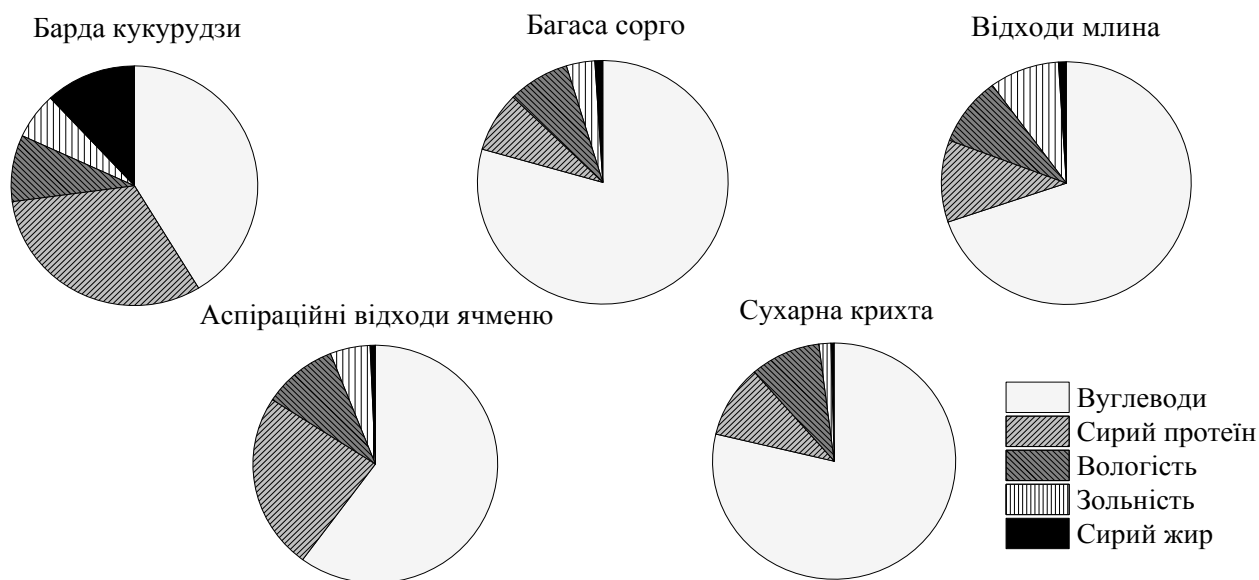


Рис. 1. Хімічний склад субстратів, %

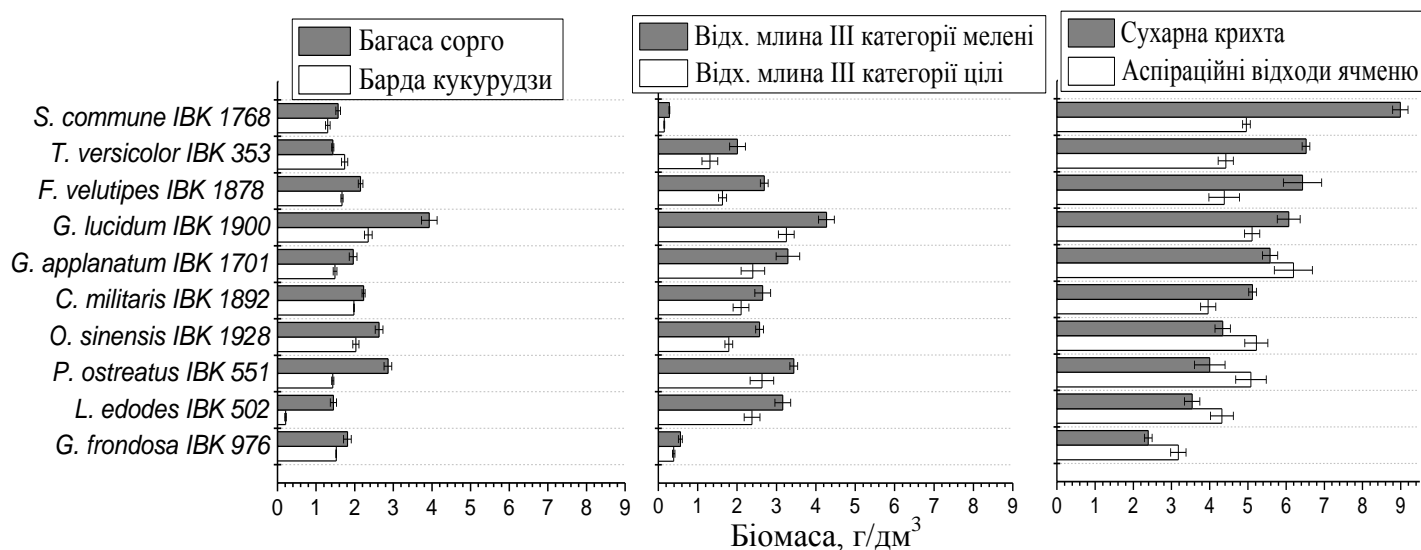


Рис. 2. Накопичення біомаси лікарськими макроміцетами на живильних середовищах із відходами перероблення зернових культур (14 діб)

При порівнянні результатів експериментів з поверхневого культивування міцелію грибів на сухарній крихті та аспіраційних відходах ячменю (рис. 2) з'ясувалось, 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/дм³ для *S. commune* IBK 1768 протягом 14 діб.

На сухарних крихтах із окремих видів хліба макроміцети утворювали таку концентрацію біомаси: на сухарній крихті з «Батона нарізного київського» – від 1,82 г/дм³ до 7,15 г/дм³; на сухарній крихті з «Хліба українського столичного» – від 2,35 г/дм³ до 9,07 г/дм³; на сухарній крихті з «Хліба білоруського» – від 1,90 г/дм³ до 8,65 г/дм³. На всіх видах сухарної крихти добре росли два види роду *Ganoderma* (концентрація біомаси становила від 5,5 до 9,1 г/дм³), а найгірше – *L. edodes* 502 та *G. frondosa* 976.

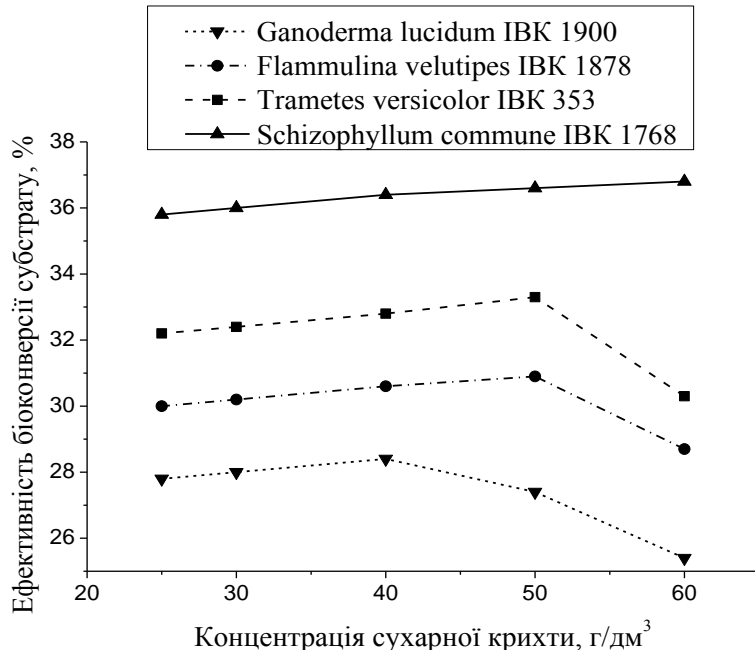


Рис. 3. Вплив концентрації сухарної крихти на ефективність біоконверсії субстрату при глибинному культивуванні лікарських макроміцетів протягом 7-ми діб (при концентраціях вищих за 60 г/дм³ спостерігалось поверхнєве обростання субстрату)

на 5-ту добу ($15,8 \pm 0,5$ г/дм³), *F. velutipes* IBK 1878 та *G. lucidum* IBK 1900 – на 7-му добу, ($14,0 \pm 0,4$) г/дм³ та ($10,0 \pm 0,4$) г/дм³ відповідно (рис. 4).

Значення рН культуральної рідини змінювалось протягом культивування грибів від початкового (рН субстрату 6,0) і коливалось в межах 3,6-5,3. Найменші значення рН спостерігалися при найбільших значеннях біомаси для всіх видів. Результати нашого подальшого дослідження глибинного культивування *G. lucidum* IBK 1900 на сухарній крихті показали, 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 [Elisashvili, 2012]. Водночас, існує припущення [Михайлова и др., 2012], що зниження

Було встановлено, що ефективність біоконверсії субстрату залежить від концентрації сухарної крихти в живильному середовищі та біологічних особливостей видів макроміцетів (рис. 3). Максимальну ефективність біоконверсії субстрату було виявлено для *G. lucidum* IBK 1900 при концентрації сухарної крихти 40 г/дм³, для *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353 – 50 г/дм³, для *S. commune* IBK 1768 – 60 г/дм³.

За результатами дослідження, на середовищі з сухарною крихтою підібраної концентрації при глибинному культивуванні найбільшу біомасу макроміцет *S. commune* IBK 1768 накопичував на 4-ту добу культивування ($24,0 \pm 0,8$ г/дм³), *T. versicolor* IBK 353 –

pH живильного середовища до 3,4-4,0 в процесі глибинного культивування макроміцетів може інгібувати подальший ріст культур.

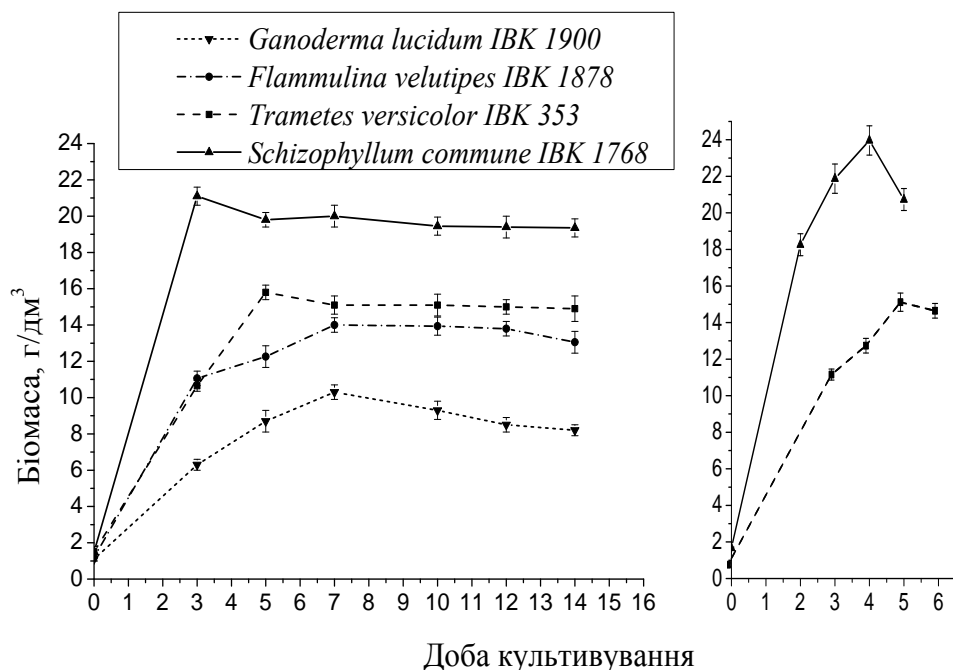


Рис. 4. Динаміка накопичення біомаси лікарських макроміцетів при глибинному культивуванні на середовищах з оптимальними концентраціями сахарної крихти (на малюнку справа відображена більш детальна динаміка накопичення біомаси для *S. commune* IBK 1768 та *T. versicolor* IBK 353, які найкраще росли на цьому субстраті)

В результаті дослідження динаміки накопичення біомаси (рис. 4), біосинтезу ендополісахаридів, сирого протеїну та розрахунку ефективності біоконверсії субстрату (рис. 5), 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.

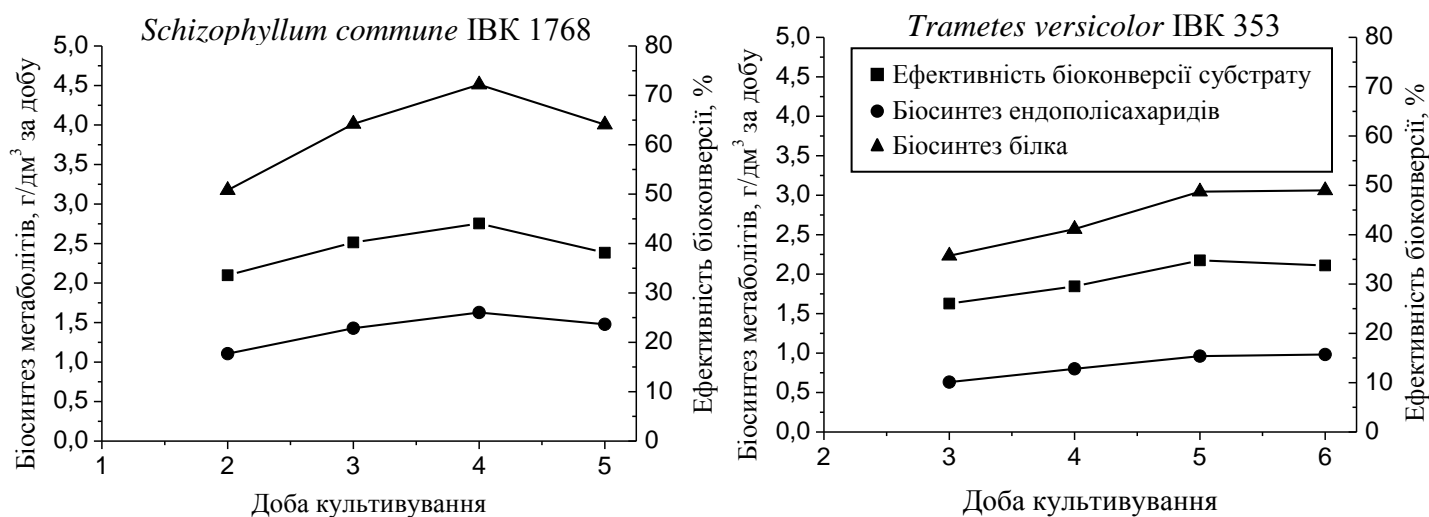


Рис. 5. Біотехнологічні параметри процесу глибинного культивування лікарських макроміцетів на живильному середовищі з сахарною крихтою

Аналіз схеми процесу глибинного культивування лікарських макроміцетів на живильному середовищі з сахарною крихтою (рис. 6) дозволяє класифікувати за Еліновим [Елинов, 1995] 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.



Рис. 6. Схема процесу глибинного культивування лікарських макроміцетів на живильному середовищі з сахарною крихтою

За результатами дослідження хімічного складу біомаси, міцелій *S. commune* ІВК 1768 на 4-ту добу глибинного культивування на живильному середовищі з сахарною крихтою містить 18,83 % сирого протеїну, 3,45 % сирого жиру, 66,06 % вуглеводів (із них 6,79 % ендopolісахаридів), а біомаса *T. versicolor* ІВК 353 на 5-ту добу – 19,85 % сирого протеїну, 2,35 % сирого жиру, 62,24 % вуглеводів (із них 6,10 %

ендополісахаридів). Енергетична цінність 100 г висушеної біомаси *T. versicolor* ІВК 353 становить 314,38 кКал, а *S. commune* ІВК 1768 – 331,89 кКал.

Білок *S. commune* ІВК 1768 можна вважати білком із високою біологічною цінністю, оскільки кількість незамінних амінокислот на 100 г амінокислот перевищує 40 г (табл. 2). Вміст незамінних амінокислот в біомасі *T. versicolor* ІВК 353 на 100 г амінокислот наближається до 40 г.

Таблиця 2

Амінокислотний та жирнокислотний профіль біомаси *T. versicolor* ІВК 353 (1) і *S. commune* ІВК 1768 (2) при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою

Амінокислоти		Відсоток від загальної кількості		Жирні кислоти (назва, формула)	Відсоток від загальної кількості			
		1	2		1	2		
Незамінні	Лізин	4,84±0,12	5,38±0,12	Ненасичені	Гексадецена (16:1)	-	0,37±0,02	
	Треонін	5,48±0,12	5,23±0,12		Октадецена (18:1)	23,45±0,21	29,67±0,33	
	Валін	7,09±0,12	6,57±0,12		Октадекадієнова (18:2)	36,59±0,33	37,89±0,38	
	Метіонін і цистин	1,27±0,11	1,39±0,11		Ейкозенова (20:1)	0,41±0,02	-	
	Ізолейцин	2,73±0,11	3,37±0,11			Доказенова (22:1)	-	0,35±0,01
	Лейцин	2,84±0,11	3,90±0,11					
	Фенілаланін і тирозин	6,84±0,12	7,24±0,12					
	3,53±0,11	4,16±0,12						
	2,76±0,11	4,16±0,11						
Сума незамінних		37,38±1,03	41,40±1,04	Сума ненасичених		60,45±0,56	68,28±0,74	
Замінні	Гістидин	1,41±0,11	2,18±0,11	Насичені	Пентадеканова (15:0)	0,61±0,03	0,39±0,02	
	Аргінін	5,54±0,12	5,98±0,12		Гексадеканова (16:0)	25,92±0,16	22,93±0,27	
	Аспарагінова кислота	10,03±0,31	9,69±0,30		Гептадеканова (17:0)	0,50±0,03	0,34±0,02	
	Серин	6,60±0,12	6,25±0,12		Октадеканова (18:0)	8,27±0,08	6,49±0,08	
	Пролін	7,32±0,12	3,87±0,11		Ейкозанова (20:0)	0,65±0,03	0,39±0,02	
	Глутамінова кислота	18,67±0,31	18,89±0,32		Докозанова (22:0)	1,91±0,01	0,76±0,04	
	Гліцин	5,51±0,12	4,82±0,11		Тетракозанова (24:0)	1,31±0,01	0,42±0,02	
	Аланін	7,54±0,12	6,91±0,12		Гексакозанова (26:0)	0,38±0,02	-	
Сума замінних		62,62±1,33	58,60±1,31	Сума насичених		39,55±0,37	31,72±0,47	

Примітки: 1- 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; 2- при підготовці зразків цистеїн окислюється до цистину, тому обидві амінокислоти визначаються разом.

Розрахунок амінокислотного скору дав можливість констатувати, що порівняно з вимогами ФАО/ВООЗ біомаса *S. commune* ІВК 1768 та *T. versicolor* ІВК 353, отримана при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, лімітована за вмістом ізолейцину (79,93 % та 54,23 % відповідно). Індекси незамінних амінокислот *T. versicolor* ІВК 353 та *S. commune* ІВК 1768 становлять 79,22 % та

94,25 %, а прогнозована біологічна цінність – 74,65 % та 91,03 % відповідно. Фракція жирних кислот біомаси *T. versicolor* ІВК 353 та *S. commune* ІВК 1768 (табл. 2) характеризувалась високим вмістом ненасичених жирних кислот (60,45 % та 68,28 % від суми жирних кислот відповідно), найбільший відсоток серед них становили октадецена та октадекадієнова жирні кислоти.

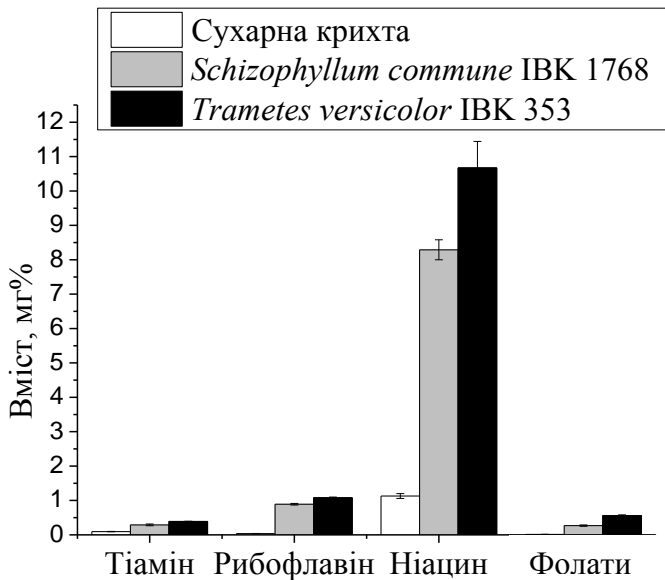


Рис. 6. Вміст вітамінів у біомасі лікарських макроміцетів та в субстраті

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 (табл. 3).

Таблиця 3

Антимікробна активність екстрактів міцелію лікарських макроміцетів при культивуванні на сухарній крихті

Назва зразку	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 дослідження антимікробної активності	ампіцилін (10 мкг) 19,6 ± 0,6 d	ампіцилін (10 мкг) 10,5 ± 0,3 e	гентаміцин (10 мкг) 16,4 ± 0,6 f	кетоконазол (50 мкг) 15,6 ± 0,6 g

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

Лектини – група білків, що здатна зв'язуватися з вуглеводною частиною глікокон'югатів, зокрема, можуть викликати аглютинацію еритроцитів крові, відіграючи роль антиаліментарних факторів харчування при потраплянні в організм людини [Нечаев и др., 2003]. 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.

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/дм³ до 6,19 г/дм³), 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/дм³ до 8,99 г/дм³).

2. Відповідно до показників максимальної ефективності біоконверсії субстрату, при глибинному культивуванні *G. lucidum* IBK 1900 оптимальна концентрація сухарної крихти становила 40 г/дм³, *F. velutipes* IBK 1878 та *T. versicolor* IBK 353 – 50 г/дм³, а для *S. commune* IBK 1768 – 60 г/дм³.

3. Серед досліджуваних субстратів для культивування міцелію макроміцетів було обрано сухарну крихту, що забезпечувала найвищі показники концентрації біомаси (до 24 г/дм³). 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 ендополісахаридів, 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/дм³ біомаси із 7 % ендополісахаридів та 19 % сирого протеїну, а *T. versicolor* IBK 353 – 16 г/дм³ біомаси із 6 % ендополісахаридів 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*

ІВК 1768, отриманого при глибинному культивуванні на сухарній крихті, він може вважатися білком високої біологічної цінності. В жирнокислотному профілі міцелію *S. commune* ІВК 1768 і *T. versicolor* ІВК 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* ІВК 1768 та 12,70 мг% для *T. versicolor* ІВК 353. Розрахована енергетична цінність міцелію макроміцетів при глибинному культивуванні на сухарній крихті: 331,89 кКал на 100 г висушеної біомаси *S. commune* ІВК 1768 та 314,38 кКал на 100 г висушеної біомаси *T. versicolor* ІВК 353.

5. Встановлено, що водні екстракти міцелію *S. commune* ІВК 1768 і *T. versicolor* ІВК 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* ІВК 353 та *S. commune* ІВК 1768, одержаних при глибинному культивуванні на живильному середовищі з сухарною крихтою, не виявляли гемаглютинувальну активність до еритроцитів чотирьох груп крові людини.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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 експериментів, 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 експериментів, 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, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, 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 *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел; глибинне культивування та підготовка 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 джерел, розроблена схема досліджень та сформульовані висновки разом зі співавторами, постановка експериментів, 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 у 2014 10934, МПК А01G 1/04 (2006. 01). (Особистий внесок здобувача: ідея проведення дослідження, патентний пошук, розроблена схема досліджень разом із науковим керівником, постановка експериментів, 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. Бісько 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, аспір., молод. вчен. та студ., 26 квітня 2011 р. – Київ, 2011. – С. 59.
11. **Іванова Т. С.**, Бісько Н. А., Барштейн В. Ю., Круподьорова Т. А., Антоненко Л. А., Мегалінська А. П. Скринінг базидіомицетов – продуцентів цінних біологічно активних речовин при культивуванні 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 бізидіомицета *Ganoderma lucidum* (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 биотехнология: 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. **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.
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. **Іванова Т. С.**, Тітова Л. О., Мегалінська Г. П. Сухарна крихта як субстрат для культивування лікарських грибів // Біотехнологія XXI століття: IX 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: IX 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 scient. 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 Scient. 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 Scient. 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.

АНОТАЦІЯ

Іванова Т.С. Біотехнологія культивування лікарських макроміцетів на відходах перероблення зернових культур. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – ДУ «ІХБГ НАН України», Київ, 2018.

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

Проведений скринінг лікарських макроміцетів на рідких живильних середовищах нового складу – з аспіраційними відходами ячменю, відходами млина III-ої категорії, сухарною крихтою, бардою кукурудзи та багасою сорго. Розроблено схему та визначено параметри біотехнологічного процесу глибинного культивування відібраних видів грибів на сухарній крихті для найвищої ефективності біоконверсії субстрату і накопичення біомаси. Вивчено харчову цінність, амінокислотний, жирнокислотний та вітамінний склад отриманої біомаси в стаціонарній фазі росту культур, а також досліджено антимікробну активність біомаси та встановлено відсутність гемаглютинувальної активності.

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

АННОТАЦИЯ

Иванова Т.С. Биотехнология культивирования лекарственных макромицетов на отходах переработки зерновых культур. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – ГУ «ИПБГ НАН Украины», Киев, 2018.

Диссертация посвящена изучению биотехнологического процесса культивирования лекарственных макромицетов на жидких питательных средах с отходами переработки зерновых культур, биохимического состава исходных субстратов и полученной биомассы с биологически активными веществами.

Проведен скрининг лекарственных макромицетов на жидких питательных средах нового состава – с аспирационными отходами ячменя, отходами мельницы III-й категории, сухарной крошкой, бардой кукурузы и багассой сорго. Разработано схему и определены параметры биотехнологического процесса глубинного культивирования отобранных видов грибов на сухарной крошке для наибольшей эффективности биоконверсии субстрата и накопления биомассы. Изучено пищевую ценность, аминнокислотный, жирнокислотный и витаминный состав полученной биомассы в стационарной фазе роста культур, а также исследовано антимикробную активность биомассы и установлено отсутствие гемагглютинирующей активности.

Ключевые слова: лекарственные макромицеты, отходы переработки зерновых культур, эффективность биоконверсии субстрата, глубинное культивирование,

биомасса, эндополисахариды, аминокислоты, жирные кислоты, витамины, антимикробная активность.

SUMMARY

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

Thesis for Scientific 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 wastes 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 nutrient media with new composition, which contain 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. Moisture, ash, crude protein, crude fat, and carbohydrate contents of substrates under study were analyzed. The bioconversion efficiency of substrates with fungal mycelium was calculated. It was demonstrated that the highest biomass accumulation and bioconversion efficiency in surface cultivation provided breadcrumb for *Schizophyllum commune* IBK 1768, *Trametes versicolor* IBK 353, *Flammulina velutipes* IBK 1878, and *Ganoderma lucidum* IBK 1900 (up to 9 g/dm³ 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. In order to achieve maximal bioconversion efficiency optimal breadcrumb concentration in medium for submerged cultivation was revealed: 40 g/dm³ for *G. lucidum* IBK 1900, 50 g/dm³ for *T. versicolor* IBK 353 and *F. velutipes* IBK 1878 as well as 60 g/dm³ 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 ± 0.8 g/dm³ and 15.8 ± 0.5 g/dm³ 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 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, mycelium of *S. commune* IBK 1768 contain amino acids with 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 biomass 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 vitamins niacin, thiamine, riboflavin, and folates content in mycelial mass of *T. versicolor* IBK 353 and *S. commune* IBK 1768 in submerged cultivation on breadcrumb is 3-43 times higher than in the substrate breadcrumb. The total content of aforementioned vitamins was 9.74 mg% for *S. commune* IBK 1768 and 12.70 mg% for *T. versicolor* IBK 353. The energy values of macromycetes mycelia in submerged cultivation on breadcrumb were as follows: 331.89 kcal per 100 g of dried *S. commune* IBK 1768 biomass, and 314.38 kcal per 100 g of dried *T. versicolor* IBK 353 biomass.

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.

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