

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.10 – МР. 1764 “С” 2020.11.12. 012 ПЗ

САВЕНКО АНАСТАСІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:635.8

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій
та екології
(назва факультету (ННІ))

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
фізіології, біохімії
рослин та біоенергетики
(назва кафедри)

(підпис) Коломієць Ю. В.
(ПІБ)
“ ” 2021 р.

(підпис) Прилуцька С.В.
(ПІБ)
“ ” 2021 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему “Оптимізація умов культивування штамів *Pleurotus eryngii* Quel.”

Спеціальність 162 “Біотехнології та біоінженерія”
(код і назва)

Освітня програма “Екологічна біотехнологія та біоенергетика”
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми
доктор сільськогосподарських наук, професор
(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис) Лісвий М.М.
(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

доктор біологічних наук, доцент
(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис) Бойко О.А.
(ПІБ)

Виконала

(підпис)

(ПІБ студента) Савенко А.В.

КИЇВ – 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Завідувач кафедри фізіології, біохімії
рослин та біоенергетики**

доктор біологічних наук
(науковий ступінь, вчене звання)

Прилуцька С.В.
(підпис) (ІНБ)

2021 року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
СТУДЕНТУ

Савенко Анастасії Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 "Біотехнології та біоінженерія"

(код і назва)

Освітня програма "Екологічна біотехнологія та біоенергетика"

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи "Оптимізація умов культивування
штамів *Pleurotus eryngii* Quel."

затверджена наказом ректора НУБіП України від "12" листопада 2020 р. № 1764

Термін завершення роботи на кафедрі _____

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. _____
2. _____
3. _____

Дата видачі завдання " " 2021 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Бойко О.А.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____

(підпис)

Савенко А.В.

(прізвище та ініціали студента)

РЕФЕРАТ

Магістерська робота виконана обсягом 54 сторінки формату А4, яка містить 2 таблиці, 22 рисунка та 51 літературне джерело.

Актуальність теми. Рациональне використання природних ресурсів, пошук нових біологічних об'єктів для отримання повноцінної білкової їжі є одним із суттєвих аспектів народного господарства. Джерелом збільшення ресурсів білка, отриманого шляхом мікробіологічного синтезу, може бути промислове виробництво міцелію вищих грибів, який за поживними та смаковими якостями має безсумнівну перевагу перед багатьма продуктами рослинного походження. Одержання білка з грибів може внести вклад у вирішення світової проблеми ліквідації білкового дефіциту.

Оптимізація умов штучного культивування та вивчення фізіологічно активних речовин базидіоміцетів - перспективних об'єктів біотехнології - є одним з важливих напрямків розвитку сучасної мікології.

При культивуванні грибів на сировині, що містить целюлозу, вміст білка в міцелії, як правило, становить не більше 20 % від сухої маси. На оптимізованих за хімічним складом субстратах вміст білка у грибній біомасі може сягати до 30 %, що значно вище, ніж у більшості злакових культур та овочів.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є оптимізація умов культивування штамів *Pleurotus eryngii* Quel., а також вивчення особливостей росту гриба при різних умовах культивування.

Для виконання поставленої мети було складено перелік завдань:

- Ознайомитися з процесом та умовами культивування *Pleurotus eryngii* в культурі та оволодіти навичками вирощування гриба *in vitro*.
- Провести оптимізацію умов культивування *Pleurotus eryngii* експериментальним методом.
- Порівняти ефективність різних умов культивування та зробити відповідні висновки.

Об'єкт дослідження – їстівний базидієвий гриб – *Pleurotus eryngii* Quel. (штам 2015) з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Предмет дослідження – процес культивування *Pleurotus eryngii* в культурі *in vitro*.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Загальна характеристика роду <i>Pleurotus</i>	11
1.1.1. Загальний опис <i>Pleurotus eryngii</i>	12
1.1.2. Загальний опис плодового тіла	13
1.1.3. Систематичне положення <i>Pleurotus eryngii</i>	14
1.1.4. Ареал поширення та природне середовище існування	15
1.2. Користь <i>Pleurotus eryngii</i>	16
1.2.1. Лікарські властивості	16
1.2.2. Харчова та поживна цінність	22
1.3. Способи вирощування та культивування <i>Pleurotus eryngii</i>	23
1.4. Опис та загальна характеристика культуральних середовищ, використаних у роботі	26
1.4.1. Опис та склад середовища Чапека-Докса (CZA)	26
1.4.2. Опис та характеристика агару солодового екстракту (MEA)	28
1.4.3. Характеристика картопляно-декстрозного агару (PDA)	30
1.4.4. Характеристика та склад глюкозо-пептон-дріжджового агару (GPYA)	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
2.1. Місце проведення експериментальної частини роботи	33
2.2. Матеріали і методи проведення досліджень	34
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РІСТ <i>P. ERYNGII</i>	42
3.1. Вплив культуральних середовищ на ріст <i>P. eryngii</i>	42
3.2. Вплив температури та рівня pH на ріст <i>P.eryngii</i>	46
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ВСТУП

З давніх часів гриби відіграють важливу роль у народній медицині. В останні десятиліття увага дослідників зосереджена на всебічному вивченні різних родів макроміцетів: *Agaricus*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Lentinus* та інших, та їх біологічно-активних вторинних метаболітів.

Рациональне використання природних ресурсів, пошук нових біологічних об'єктів для отримання цінної білкової їжі є одним із суттєвих аспектів народного господарства. Джерелом збільшення ресурсів білка, отриманого шляхом мікробіологічного синтезу, може бути промислове виробництво міцелію вищих грибів, який за поживними та смаковими якостями має безсумнівну перевагу перед багатьма продуктами рослинного походження. Одержання білка з грибів може внести вклад у вирішення світової проблеми ліквідації білкового дефіциту.

Оптимізація умов штучного культивування та вивчення фізіологічно-активних речовин базидіоміцетів - перспективних об'єктів біотехнології - є одним з важливих напрямків розвитку сучасної мікології.

При культивуванні грибів на сировині, що містить целюлозу, вміст білка в міцелії, як правило, становить не більше 20 % від сухої маси. На оптимізованих за хімічним складом субстратах вміст білка у грибній біомасі може сягати до 30 %, що значно вище, ніж у більшості злакових культур та овочів.

Значний інтерес представляє один з важливих видів їстівних грибів *Pleurotus eryngii* Quel., який часто називають королівським трубчастим грибом, валторновим грибом, королівською гливою, королівським коричневим грибом і Xingbaogu (Китай).

Pleurotus eryngii (Королівська глива, Ерінги) - це смачний гриб з великим ринковим потенціалом. Більшість свіжих продуктів в Європі імпортується з Республіки Корея, тому активне виробництво допоможе підвищити економічний статус країни. Промислове вирощування *Pleurotus*

erungi може мати великі перспективи для України, так як його виробництво в Європі не надто налагоджене. Це може статися тільки в тому випадку, якщо врожайність підніметься і стане більш стабільною. Так, наприклад, у Нідерландах існує лише дуже невелика кількість виробників королівської гливи. В Іспанії (*Micelios Fungisem*) і Німеччини (*Pilzfarm Helvesiek*) виробництво має певне розповсюдження, в той час як в Нідерландах Берт Радемакере з *Fungi 2000* виробляє відповідний субстрат лише в невеликих масштабах [10].

Королівська глива прекрасно підходить для вертикального землеробства. Це економить ґрунт - все більш дорогий і рідкісний товар. Гриб також вимагає дуже мало світла, що заощаджує енергію та інші витрати.

Чудовий смак і тривалий термін зберігання дають королівському устричному грибу перевагу. Не можна забувати і про унікальні властивості даного гриба – він має високій вміст вітамінів, білків та полісахаридів, низьку калорійність, повну відсутність холестерину, а також присутність всіх незамінних амінокислот. Поряд з концепцією виробництва їстівних грибів, цей вид також може бути використаний для переробки лігноцеллюлозних матеріалів та відходів. Королівська глива - це гриб, який може селективно розкласти лігнін в лігноцеллюлозному середовищі (наприклад, деградація лігніну при практично повній відсутності целюлози). Це значно полегшить доступ до полісахаридної целюлози, джерела здобуття біоенергії і біопластика [1].

Крім того, це лігнінолітичний гриб, який здатний регенерувати сільськогосподарські продукти або фактичні відходи, щоб стати здоровим витратним матеріалом для домашніх тварин. Це забезпечує фермерам можливість дешево вирощувати тварин для отримання м'яса або молока. Це, в свою чергу, допомагає підняти на новий щабель здоров'я людей, якщо поживна їжа стане доступною для багатьох.

У тому ж світлі гриб, завдяки своїм лігнінолітичним властивостям, допомагає позбавити навколишнє середовище від шкідливих побічних продуктів. Серед матеріалів, знешкоджених властивостями цього гриба, є забруднюючі речовини, які є продуктом промислової діяльності [28].

Дослідження показали, що екстракти плодових тіл *P. eryngii* мають численні лікарські властивості, такі як протиракова, протівірусна, антиоксидантна, протимікробна, протиалергічна, протизапальна, імуномодуюча, гіполіпідемічна, естрогеноподібна активність. З *Pleurotus eryngii* були виділені різні біологічно активні сполуки: полісахариди (β -1,3-глюкани), ловастатин, протеаза (плеврерин), ерингін, рибонуклеаза, ерингеолізін, ерготіонейн, 17β -естрадіол, протеїн kb68AB, кислі глікосфінголіпіди.

Основною проблемою його доступності та використання є обмеженість урожаїв цього гриба в дикій природі та їх сезонність. Ці фактори сприяли введенню цього гриба в культуру та пошуку простих методів культивування. Незважаючи на численні статті про вирощування *P. eryngii* на агропромислових відходах на твердому середовищі, проведено обмежену кількість робіт з дослідження деяких факторів зростання міцелію в чистій культурі.

Очевидно, що вплив умов культивування на виробництво біомаси міцелію та терапевтичні властивості грибних препаратів дуже важливий [17]. Таким чином, основні фактори, що впливають на зростання міцелію *P. eryngii* та його терапевтичний ефект, такі як культуральне середовище, температура, джерела вуглецю та азоту, pH, вивчені фрагментарно. Звідси випливає, що питання оптимізації умов зростання цього виду грибів та синтезу терапевтично активних метаболітів є актуальним.

Метою цієї роботи було вивчення впливу умов культивування на зростання міцелію та терапевтичну активність *Pleurotus eryngii*.

В даній роботі об'єктом дослідження був їстівний базидієвий гриб – *Pleurotus eryngii* Quel. (штам 2015) з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [36].

Предметом дослідження був процес культивування *Pleurotus eryngii* в культурі *in vitro*.

Для виконання поставленої мети було складено перелік завдань:

1. Ознайомитися з процесом та умовами культивування *Pleurotus eryngii* в культурі та оволодіти навичками вирощування гриба в *in vitro*.
2. Провести оптимізацію умов культивування *Pleurotus eryngii* експериментальним методом.
3. Порівняти ефективність різних умов культивування та зробити відповідні висновки.
4. Опрацювати отримані результати та зробити відповідні висновки.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика роду *Pleurotus*

Рід *Pleurotus*, що належить до родини *Pleurotaceae* порядку *Agaricales* класу *Basidiomycetes* відділу *Mycophyta*, є їстівним макрогрибком, що вирощується у всьому світі, особливо в Південно-східній Азії, Європі і Африці, відносяться переважно до ксилотрофів, мешкають на мертвій деревині. Родина включає більше 30 видів.

Ці базидіоміцети займають друге місце у світовому виробництві грибів.

Їх популярність можна пояснити простотою і низькою собівартістю виробництва, смаковими якостями і високою біологічною ефективністю. Вони широко відомі як гливи і вважаються білими розкладаючими грибами за білий міцелій і ефективну деградацію деревних або некомпостованих лігноцелюлозних матеріалів. Існує близько 70 ідентифікованих видів роду *Pleurotus*, але лише небагато з них вирощуються в комерційних цілях, такі як *Pleurotus ostreatus* Kumm, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus djavan* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., *Pleurotus cystidiosus* O.K. Mill., *Pleurotus florida* (Mont.) Singer і *Pleurotus sajor – caju* (Fr.) Singer. В порівнянні з іншими грибами, *Pleurotus* мають коротший час росту. Гливи ефективно ростуть при температурі 20-30°C і вологості 55%-70% на різних лігноцелюлозних субстратах [11], таких як бавовняні відходи, рис і пшенична солома, деревна тирса і тріски, качани кукурудзи, жмих з цукрової тростини, стебло кукурудзи і сорго, різне листя і інші залишки.

Плодові тіла, як правило, сидячі або з бічною ексцентричною ніжкою, рідше з центральною, поодинокі або зібрані в групи від декількох до кількох десятків екземплярів. Шляпка 1,5-30 см в діаметрі. За структурою вона м'ясиста, суцільна, округлої форми з тонким краєм. Також зустрічається вуховидна, тарілкоподібна і практично кругла форма. У молодого гриба зустрічається капелюшок від шоломовидної до випуклої форми з загорнутим краєм, у міру дорослішання він стає плоским або широковоронкоподібним, а

край перетворюється в хвилястий або лопатовий. Край часто порізаний, інколи просвічуємий. Поверхня у капелюшка гладка, глянсова. У вологому кліматі на капелюшку гриба з'являється міцеліальний наліт [43]. Колір капелюшка гливи варіюється від темно-сірого або бурого у молодих грибів до попелясто-сірого з фіолетовим нальотом у старих. Іноді капелюшок вицвітає до білого, сірого або жовтого кольору.

М'якуш пружний, сухий і м'ясистий; споровий порошок білий, кремовий, рожевуватий або бузковий [45].

1.1.1. Загальний опис *Pleurotus eryngii*

Pleurotus eryngii - великий, їстівний гриб, родом з Європи і Азії. Хоча в дикій природі він рідкісний, його вирощують у всьому світі, він популярний завдяки своєму маслянистому смаку і яйцевидній текстурі, особливо в деяких стравах азіатської кухні. Гливи (*Pleurotus*) займають третє місце після білого гриба і шиїтаке в світовому виробництві грибів. Глива королівська (*Pleurotus eryngii*) належить до сімейства глизових грибів, які є їстівними, базидіоміцетами і сапрофітами. Як і всі сапрофітні гриби, Ерінги харчуються целюлозою і лігніном. Ці речовини вони споживають з неживих рослинних відходів (листяна деревина, тирса, стружки, соняшникове лушпиння, солома злаків, гречане лушпиння, шкарлупа горіхів, зерен кави і т.п.).

Він вважається кращим за решту видів *Pleurotus* завдяки чудовій консистенції шапки і стебла, кулінарним якостям і найтривалішому терміну зберігання, у порівнянні з іншими видами *Pleurotus*. В останні роки *Pleurotus eryngii* був комерційно вирощений у Китаї, Японії та Тайвані, та впевнено завоює увагу та любов споживачів, завдяки своїм неповторним смаку та текстурі.

Цей вид має багато загальних назв, у тому числі королівська глива, французький ріг, королівський гриб-труба і королівська труба, - використання наукової назви допомагає уникнути плутанини. Назва "Королівська устриця" натякає на її тісний генетичний зв'язок з популярними, а також їстівними

гливами (включаючи *Pleurotus ostreatus*) - групою видів, що ростуть в Північній Америці проте "король" не дуже схожий на своїх родичів.

1.1.2. Загальний опис плодового тіла

P. eryngii має товсте вертикальне біле стебло і відносно невелику коричневу, біло-кремову або сіру шапочку 4,5-13 см в діаметрі, яка є дуже м'яккою, плоскою, опуклою, неправильною за формою, гладкою [29]. У молодого гриба в центрі капелюшки є горбик (рис. 1.1), потім вона стає плоскою і втиснутою (рис. 1.2).

Пластинки розташовані по низхідній, широкі, білувато-рожеваті чи сіруваті, розташовані на деякій відстані один від одного, тонкі. Плодові тіла в природних умовах розвиваються прямо із землі. Субстратом для грибниці служать відмерлі рослинні залишки. Плодові тіла, на відміну від інших видів *Pleurotus*, ростуть не в друзах, а поодинокі.

Ніжка 2-6 см в довжину і до 4 см в діаметрі, центральна або бічна, циліндричної форми, щільна. Колір ніжки білуватий, у зрілого гриба - бурохристий. Спори 8,5-14 x 4,2-5,8 мкм, циліндричні, подовжено-яйцевидні.

Споровий порошок білий чи кремовий. М'якоть біла, еластична, у молодих екземплярів соковита, із віком стає волокнистою, із запахом борошна, що відволожилося. Вона володіє білим кольором з легким рожевим відтінком.

Окремі екземпляри можуть досягати 300 грам за вагою.



Рис. 1.1 Молоді гриби *Pleurotus eryngii* [21]



Рис. 1.2. Дорослі екземпляри *Pleurotus eryngii* [21]

1.1.3. Систематичне положення *Pleurotus eryngii*

Класифікація *Pleurotus eryngii* [27] виглядає наступним чином:

Домен: *Eukaryota* (Еукаріоти)

Царство: *Fungi* (Гриби)

Підцарство: *Dikarya* (Вищі гриби)

Відділ: *Basidiomycota* (Базидіоміцетові)

Підтип: *Agaricomycotina*

Клас: *Agaricomycetes* (Агарикоміцети)

Підклас: *Agaricomycetidae*

Порядок: *Agaricales* (Агарикальні)

Родина: *Pleurotaceae* (Плевротові)

Рід: *Pleurotus* (Плеврот)

Вид: *Eryngii* (Ерінги)

1.1.4. Ареал поширення та природне середовище існування

Поширення *Pleurotus eryngii* бере свій початок з берегів Середземного моря. Тому він зазвичай росте та плодоносить там, де помірно тепло. Цей сорт рідкісний, але він був ідентифікований як дикоростучий в різних частинах світу: це південна частина Росії, Центральна Азія (Пакистан, Індія, Малайзія), Європа, Північна Америка, він зустрічається також на Близькому Сході і в північній частині Африки (Судан і Єгипет); в країнах Середземномор'я, на території Німеччини, Португалії, Данії, Словаччини, Франції, Польщі.

Інші країни, які узяли на себе зобов'язання вирощувати цей гриб на комерційній основі, включають Японію, Південну Корею, Італію, Австралію, Південну Африку і США. У Росії ці гриби ростуть майже скрізь, навіть у Східному Сибірі та Приморському Краї. Цей вид глив плодоносить тільки у весняний період.

Назва *Eryngii* вказує на те, де гриб зустрічається в дикій природі: на коренях пуповинних рослин, зокрема, *Eryngium* і *Heracleum* [10], а також на їх рештках (відходи лісозаготівель, пеньки, повалені стовбури, сушняк). На цих рослинах він росте як паразит - велика відмінність, наприклад, від зимової гливи, яка добре росте на мертвих листяних деревах.

Іноді *Eryngii* можна зустріти і на коренях троянд чи сімейства *Ariaceae* / *Umbelliferae*. Нерідко в якості субстрату виступає деревина липи, вільхи, бука, осики, дуба. *Pleurotus eryngii* створюють великі групи, кількість плодових тіл у

яких може доходити до 30 і навіть більше і масою до трьох кг. При плодоношенні гриби не стикаються один з одним, та на деякій відстані один від одного.

Плодоносить глива королівська тільки у весняні місяці. У південних областях вона з'являється вже в березні. Гриб схильний до паразитизму. Двійників у виду немає.

1.2. Користь *Pleurotus eryngii*

1.2.1. Лікарські властивості

Будучи свого роду популярною традиційною їжею в Азії, гриби протягом тисячоліть цінуються як ресурс підтримки здоров'я. В останні роки багато макромолекул (наприклад, полісахариди, полісахарид-протеїни / пептиди і білки) і низькомолекулярних молекул (наприклад, цереброзиди, ізофлавоїни, катехол, аміни, тріацилгліцеріни, сесквітерпени і стероїди) вважаються основними біологічними компонентами їстівних / медичних грибів.

Pleurotus eryngii, загальний їстівний і лікарський гриб, що містить різні корисні біоактивні сполуки, які благотворно впливають на здоров'я, сприяючи лікуванню різних захворювань та підтримання гарного самопочуття, активізуючи імунну систему для виконання безлічі захисних функцій. Багато екстрактів *Pleurotus eryngii* через імунорегуляторні чинники здійснюють значний викид протівірусної активності, гіполіпідемічної активності і імуностимулюючої активності. Таким чином, препарати на основі *Pleurotus eryngii* можуть бути розроблені як функціональна їжа і потенційний терапевтичний агент при захворюваннях людини, особливо при онкологічних захворюваннях.

Рід Плеврота (*Pleurotaceae*, вищі базидіоміцети) охоплює групу лігнінотрофних грибів, які є їстівними і лікарськими. Види роду *Pleurotus* є важливими грибами із-за легкості вирощування, їх живильної цінності і лікувальних властивостей. Наукові дані підтверджують їх важливість як

виробників речовин, що володіють антибіотичною, протипухлинною, антиоксидантною, протимікробною, прогираквою, гіпоглікемічною, імуностимулюючою протизапальною і гіпохолестеролімічною активністю. [13]

Багатий склад *Pleurotus eryngii* дозволяє застосовувати її як лікувальний засіб проти таких захворювань:

- короткозорість;
- інвазія гельмінтами;
- алергія;
- пухлини;
- далекозорість;
- проблеми з кишечником;
- гіпертонія;
- хвороби судин і серця;
- цукровий діабет.

З королівської гливи також роблять корисні живильні маски для обличчя, які звожують шкіру і позбавляють від зморшок.

Гриб *Pleurotus eryngii* володіє антиоксидантами, які допомагають утримати хворобу подальше від організму. Антиоксидант, що міститься в цьому грибі, має форму амінокислоти, відомої як ерготионеїн. Коли людина споживає гриб, ерготионеїн потрапляє в уразливі ділянки тіла і починає їх очищати. Ці чутливі зони включають в себе очі, нирки і печінку. Антиоксиданти - це елементи, що завертають окислення назад. Окислення - це процес, що викликає гниття або розпад речовин [13]. Наприклад, процес окислення викликає гниття шматка м'яса, в той час як цей же процес викликає розпад клітин організму. Клітини тіла не обов'язково гниють після окислення, але створюють вільні радикали, які, по суті, і є пошкодженими клітинами. Подібно до того, як пошкоджена ділянка плоду викликає гниття більшої кількості плодів, так і пошкоджені клітини організму викликають глобальне розповсюдження хвороби організмом. Ось як ракові клітини поширюються. В даний час

встановлено, що даний антиоксидант дуже цінний, полісахарид з грибів має значну антиоксидантну активність при видаленні вільних радикалів.

У багатьох дослідженнях повідомлялося, що одна з біологічних активностей екстракту *Pleurotus eryngii* пов'язана в основному з антиоксидантною активністю, а основний зміст - це поліфеноли і полісахариди. Антиоксидантну активність не оцінювали по зниженню істужності (аналізи FolinCiocalteu і Ferricyanide / Prussian blue), активності поглинання вільних радикалів (DPPH-аналіз) і пригнічення перекисного окислення ліпідів (аналізи каротину / лінолеату і TBARS).

Рак - це всесвітня хвороба, яка завдає серйозної шкоди здоров'ю людини. Перемогти рак - одна з найважливіших тем досліджень в галузі медицини сьогодення. Нещодавно з *Pleurotus eryngii* були відкриті і очищені деякі природні активні компоненти, в тому числі полісахарид, полісахарид-протеїн, дитерпеноїд, тритерпен. Дані компоненти проявляли значну антиракову активність [41].

Біологічні дослідження показали, що полісахариди з *Pleurotus eryngii* зіграли головну роль в підвищенні протипухлинної активності. Цзин і ін. [19] повідомили, що екзополісахариди з *Pleurotus eryngii* демонструють вищу протипухлинну здатність клітин гепатоми людини. Протипухлинна активність збільшувалася концентраційно-залежним чином і досягала 61,4% при концентрації 400 мкг / мл.

Цей гриб також несе статини, які є сполуками для боротьби з хворобами. Холестерин накопичується в організмі, як правило, через погані звички харчування, в основному за рахунок регулярного вживання рафінованої їжі. Іншим способом нагромадження холестерину в організмі є споживання волокнистих продуктів, які готувалися на сильному вогні протягом тривалого періоду часу до тих пір, поки поживна цінність не знизилася.

Особливе з'єднання, виявлене в грибі, називається Ловастатин. Це з'єднання допомагає очистити кровоносну систему від холестерину. Як тільки кров звільняється від холестерину, поліпшується кровообіг і організм відчуває себе здоровішим. Дослідження, проведені на мишах в 2009 році, показали, що *Pleurotus eryngii* також контролює інсулін в організмі [30].

Відомо, що *Pleurotus eryngii* володіє гіпохолестеролемічною активністю. Alam N та ін. досліджували вплив *Pleurotus eryngii* на біохімічну функцію і гістологію у гіперхолестеринемізованих щурів [2]. При застосуванні 5% порошку *Pleurotus eryngii* до гіперхолестеринемічних щурів, ліпідні профілі плазми (плазмові ТК, ТГ, ЛПВН-3, ЛПВЩ-3, ВЛП-3, ТЛ та ЛП у НХК щурів) значно знизилися в порівнянні з контрольною групою, у той час як загальний винос ліпідів і холестерину в фекаліях збільшився.

Крім того, при введенні в раціон харчування 3% порошку *Pleurotus eryngii* до мишей з аполіпопротеїновою недостатністю в сироватці крові, були знижені концентрації загального холестерину (ТХ) на 12 тижн [24]. Передбачається, що прийом порошку *Pleurotus eryngii* може принести користь здоров'ю, моделюючи фізіологічні функції, що складаються з різних атерогенних ліпідних профілів.

Нагальною проблемою в сучасній медицині залишається також профілактика і лікування вірусних захворювань. Вірусна інфекція є однією з найбільш складних глобальних проблем, пов'язаних з регулярними широкомасштабними епідеміями або пандеміями, що призводять до високих показників смертності в усьому світі. Вакцина *Pleurotus eryngii* була досліджена на інгібіторну активність проти ВІЛ [38]. Результати показали, що вакцина активна проти зростання ВІЛ-1 з IC50 2,2 мкМ шляхом пригнічення зворотної транскриптази ВІЛ-1. Протеаза, позначена як плеврін, виділена зі свіжих плодових тіл їстівного гриба, викликала $(23,1 \pm 0,6)\%$ і $(91,4 \pm 3,2)\%$ інгібування зворотної транскриптази ВІЛ-1 на відстані 3 і 30 мМ відповідно

[38]. Результати показали, що для протеази, що володіє анти-BCL-протеазною активністю, існує дозовано-залежна залежність.

Цей гриб також є відмінним енергетичним бустером, і багато спортсменів розмірковують про те, як і де вони можуть знайти даний гриб, щоб включити його в свій раціон. *Pleurotus eryngii* також сприяє підвищенню рівня крові [28]. Це важливо в епоху, коли кількість людей, які страждають на анемію, зростає. Живильні речовини, що містяться в цьому грибі і сприяють підвищенню рівня гемоглобіну, вважаються безцінними в медицині.

Дослідження на мишах виявили протизапальні властивості глив [18]. Це говорить про те, що вони можуть бути корисні як частина дієти, орієнтованої на зниження запальних процесів. Такі хвороби, як артрит, фіброміалгія і м'язові болі, як правило, характерні для неправильно спрямованого запалення, і всі вони потенційно можуть виграти від режиму харчування, який високий в протизапальних продуктах, таких як гливи.

Також, очищений полісахарид з *Pleurotus eryngii* володів сильною здатністю інгібувати накопичення ліпідів в пінних клітинах, в результаті чого вміст ліпідів у клітині становив лише близько 28,06% в порівнянні з 100% у контролі. Результати показали, що *Pleurotus eryngii* може бути рекомендований в якості потужного профілактичного засобу проти гіперхолестеринемії, гіперліпідемії [9].

Повідомляється також, що гриб *Pleurotus eryngii* володіє антибактеріальними властивостями. Існує дуже багато хвороб, які викликаються бактеріями, включаючи холеру і правець. Тому рослина, здатна боротися з бактеріями, безсумнівно, рятує життя. Це тим більш важливо, що природний засіб, такий як гриб, рідко має негативні побічні ефекти.

Коротка інформація про терапевтичні ефекти і відповідним їм біологічно активні сполуки *Pleurotus eryngii*, представлена в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1.

Терапевтичний ефект і біоактивні сполуки *Pleurotus eryngii* [41].

Джерело накопичення	Біоактивні компоненти	Терапевтичний ефект
Плодове тіло	Полісахарид	Протиракова активність/ Антиоксидантні/імунomodуючі ефекти /гіполіпідемічна/ антимікробна активність
	Полісахарид-протеїн	Антиканцерогенна активність
	Ерингін (Eryngin)	Антимікробна активність
	Лакказа (Laccase)	Антивірусна активність
	Кислотні глікофосфінголіпіди	Імуно-модулюючий ефект
	Водні екстракти	Імуно-модулюючий ефект, гіполіпідемічна активність
Міцелій	Екстракти метанолу	Антиоксидантна активність
	Екстракти етанолу	Антимікробна/протиалергенна активність
	Водні екстракти	Антивірусна активність
Спорокарп	Пентациклічні тритерпеноїди	Протиракова активність

1.2.2. Харчова та поживна цінність

Це гриб з великою кількістю живильних речовин, включаючи вуглеводи, білки, вітаміни, мінерали і клітковину.

Якщо ми подивимося на харчові переваги глив [26], то ось деякі з їхніх явних переваг:

– прекрасне джерело рибофлавіну, ніацину, пантотенової кислоти, фосфору, калію, міді і харчових волокон;

– хороше джерело білка, тіаміну, вітаміну B6, фолату, заліза, магнію, цинку і марганцю;

– дуже низький рівень насичених жирів і холестерину;
– калорійність гливи королівської становить всього лише близько 35 на 100 гр.

Оскільки королівські устричні гриби є гідним джерелом білка, вони є хорошим доповненням до веганської або вегетаріанської дієти. Вони не є повним джерелом білка, тому, якщо ви вегетаріанець або веган, не забудьте включити в свій раціон харчування різні джерела білка. Це допоможе вам отримати всі необхідні амінокислоти.

Гливи королівські також можна розглядати як низьковуглецеву їжу та застосовувати для боротьби з зайвою вагою, завдяки досить низькій калорійності, присутності у великих кількостях клейковини та харчових волокон.

В м'якушеві цього грибу містяться всі необхідні поживні елементи для нормальної життєдіяльності людини, такі як:

- Вітаміни (B, PP, C, E, D2);
- Мінерали (Залізо, Кальцій, Йод, Калій);
- Амінокислоти (Лейцин, Валін, Треонін та Фенілаланін);
- Вуглеводи (20% від загальної кількості вуглеводів складають фруктоза, глюкоза та сахароза. Ці вуглеводи легко перетравлюються, та не призводять до формування та відкладів жиру);

- Полісахариди,
- Жири (у складі присутні у невеликих кількостях, представлені поліненасиченими жирними кислотами) [44],
- Білки (які складають четверту частину сухої речовини гриба).

Королівська глина насичена білками, котрі чудово засвоюються організмом, а її склад наближений до м'яса та молока. Як було сказано вище, м'якоть містить кислоти, що активно знижують рівень холестерину, а також зменшують ризик розвитку атеросклерозу. Її вживання підвищує імунітет і сприяє відновленню балансу речовин в організмі.

Проте зловживати споживанням такого “всесильного” гриба не варто. Щоб його корисні властивості приносили лише користь, вживати в їжу гливи рекомендується не більше двох раз на тиждень, не більше.

Також в ньому міститься хітин, який практично не розкладається та не перетравлюється людським організмом [44]. Тому у процесі приготування, перед вживанням, *Pleurotus eryngii* необхідно обов'язково піддати термічній обробці, бо хітин розкладається лише при дії високих температур.

1.3. Способи вирощування та культивування *Pleurotus eryngii*

В світі існує безліч штамів *P. eryngii*, які широко культивуються. Різні штами королівських глив по-різному реагують на різні субстрати, добавки, кількість добавок і екологічні чинники в аспектах пробігу міцелія, середньої врожайності і якості.

Головна особливість гриба, що робить його популярним для вирощування – його стійкість до вірусів і бактеріальних уражень. Крім того, цей вид добре переносить зберігання і перевезення, при цьому абсолютно не втрачає смаку і зовнішнього вигляду.

Також великим важливим фактором є те, що технологія вирощування дуже проста і обходиться набагато дешевше, ніж, наприклад, культивування шампіньйонів.

У природних умовах вирощування ерінгі на деревині необхідно починати наприкінці квітня-травні, коли встановиться стійка тепла погода. У приміщенні вирощувати ці гриби можна круглий рік за умови опалення в холодну пору року. Оптимальною температурою буде діапазон від 10 до 27 градусів.

Степовий гриб активно культивується в промислових масштабах. Він невибагливий до умов вирощування і дає хороший урожай. Процес займає близько трьох тижнів.

Так, наприклад, в Азії їх вирощують у пляшках і банках. Плодове тіло з'являється з горічка ємності, встановленої вертикально або горизонтально за спеціальною технологією. Вирощують степову гливу в ящиках, поліетиленових пакетах, відкритому ґрунті.

Pleurotus eryngii має безліч варіацій та типів субстратів для промислового культивування. Гриб найкраще росте на постійно оновлюючій тирсі дерев'яних порід в автоклавуємих мішках для вирощування. Королівські устриці також добре ростуть на соломі, проте, на відміну від інших видів устричних грибів, врожайність буде знижена. Звичайні методи вирощування глив на соломі дають низький урожай: від 8 до 12% маси субстрату. Крім того, на пастеризованому субстраті багаторазово виникають інфекції. Культиватори також повідомляють, що King Oyster буде мати більш тривалий термін зберігання і кращу текстуру, якщо її вирощувати на тирсі, а не на соломі.

Люблячі дерево штами, які важко культивувати на пастеризованому субстраті, можна добре вирощувати на стерилізованому субстраті. Це відноситься як до "єнокітаке", так і до "королівського устричного гриба". Субстрат повинен бути поміщений в контейнер, стійкий до високих температур; міцелій повинен мати достатньо місця для дихання на більш пізній стадії. Найбільш часто використовувані контейнери - це пластикові пакети (в Китаї) і пляшки (на Тайвані і в Японії).

Залежно від трудовитрат, процес більш-менш автоматизовано. Є спеціальна техніка, яка змішує субстрат, додає воду, заповнює пляшки, робить отвір в субстраті і вставляє пробку. У 1100-мілітрової пляшці зазвичай міститься близько 650 грам підкладки. Пляшки стерилізовані в автоклавах висотою. Потім спеціальна машина автоматично ін'єктує пляшки з екземплярами. Потім укладені в штабель ящики проводять близько 6 тижнів в інкубаційному приміщенні.

Кількість отворів або перфорацій в контейнері, де вирощуються королівські устричні гриби, дуже впливає на врожайність. Експеримент, проведений доктором Пенгом, TARI (Taiwan Agricultural Research Institute) в 1996 році показав, що при використанні пластикових пакетів, що містять 1,2 кг субстрату, закритих пробкою, занадто мало отворів давало менший урожай.

Мішки, в яких була видалена тільки пробка, дали середній вихід 8,4%. Мішки, прорізані в нижній частині, а потім укладені горизонтально, дали середній вихід 12,8%.

На відміну від інших устричних грибів, King Oyster вирає від шару оболонки. Використовують зазвичай торф'яний мох 50/50 і вермикуліт з 1% гідратованим вапном для запобігання забруднення обсадної колонії [8].

Коли збирати урожай *Pleurotus eryngii* – залежить від потреб культиваторів. Наприклад, якщо гриби молоді та невеликі, вони мають більш м'яку та ніжну структуру і смак, проте, при цьому спостерігається нижчий рівень врожайності. Але в кулінарії дуже важлива ніжка гриба, яка більша у зрілих екземплярів, і урожайність, відповідно, буде вищою за рахунок більшого часу вирощування (рис. 1.3)



Рис. 1.3. Плодові тіла королівської гливи на різних стадіях розвитку [8]

1.4. Опис та загальна характеристика культуральних середовищ, використаних у роботі

1.4.1. Опис та склад середовища Чапека-Докса (CZA)

Середовище Чапека також називається агаром Чапека (CZA), названий на честь винахідника - чеського ботаніка Фрідріха Йоганна Франца Чапека (1902-1903). Пізніше CZA був модифікований іншим американським винахідником, хіміком Артуром Вейландом Доксом (1910), внаслідок чого його назва стала "середовище Чапека-Докса", а готується воно за формулою, розробленою Томом і Черчом [34].

Воно рекомендується для використання в якісних процедурах культивування сапрофітних грибів та ґрунтових бактерій. Середовище містить сахарозу як єдине джерело вуглецю і нітрат як єдине неорганічне джерело азоту (рис.1.4.).



Рис. 1.4. Агар Чапека-Докса

Склад агару Чапека Докса (г):

Цукроза 30,0;

Нітрат натрію 2,0;

Діпотасіум фосфат 1,0;

Сульфат магнію 0,5;

Хлорид калію 0,5;

Сульфат заліза 0,01;

Агар 15,0;

Дистильована вода (D/W): 1000 мл.

Кінцевий pH 7,3+/-0,3 при 25°C.

Приготування агару Чапека-Докса.

Необхідно суспендувати 49,01 г агару Чапека Докса в 1 л очищені/дистильованої або деіонізованої води. Нагріти до кипіння, щоб

середовище повністю розчинилося. Далі стерилізувати автоклавуванням (121°C) протягом 15 хвилин. Після автоклавування залишити для охолодження до $45-50^{\circ}\text{C}$. Добре перемішати перед дозуванням.

Налити агар Чапека Докса у кожен чашку Петрі та залишити їх на стерильній поверхні до застигання агару. Тримати чашки Петрі в холодильнику при температурі $2-8^{\circ}\text{C}$ [33].

1.4.2. Опис та характеристика агару солодового екстракту (MEA)

Агар солодового екстракту являє собою багате поживними речовинами середовище для культивування, виділення та нумерації широкого спектру екологічних та патогенних дріжджів та пліснев.

Агар солодового екстракту є середовищем світло-кремового кольору (рис.1.5.). Він має кислий рН ($\text{pH } 4,9 \pm 0,2$), що забезпечує оптимальне зростання дріжджів та пліснев, обмежуючи при цьому зростання бактерій [17]. Агар з екстрактом солоду містить мальтозу як джерело енергії для дріжджів і пліснев. До складу також входять декстрин, який є полісахаридом, отриманим з високоякісного крохмалю, та гліцерин, що є джерелами вуглецю. З іншого боку, пептон є джерелом азоту.



Рис. 1.5. Агар солодового екстракту (MEA)

Склад (г/л):

Солодовий екстракт 30,0;

Мікологічний пептон 5,0;

Агар 15,0.

Кінцевий pH 5 $\pm$ 0,2 за 25°C [3].

Агар з екстрактом солоду найкраще інкубувати при температурі 25-30°C і перевіряти на зростання через 48 годин. Можливо, буде потрібна більш тривала інкубація, але найкраще перевіряти через 48 годин. При інкубації при кімнатній температурі слід залишити як мінімум на 5 днів, до 7 днів.

Принцип та інтерпретація:

Солодовий екстракт містить полісахариди, які використовуються як джерело енергії. Це також робить середовище кислим.

Мікологічний пептон є джерелом азоту. Агар є загущуючим агентом, що швидко дає пише зростання з типовою морфологією та пігментацією.

Молочна кислота, винна кислота чи антибіотики пригнічують зростання бактерій і роблять середовище більш селективним.

1.4.3. Характеристика картопляно-декстрозного агару (PDA)

Картопляно-декстрозний агар (PDA) використовується для культивування грибів/ (рис.1.6.). Картопляно-декстрозний агар (PDA) – це середовище загального призначення для дріжджів та пліснев, до якого можна додавати кислоту або антибіотики для придушення росту бактерій [8]. Він рекомендується для методів підрахунку числа пластин у продуктах харчування, молочних продуктах та тестування косметики. PDA може використовуватися для вирощування клінічно значимих дріжджів та пліснев. Багата поживними речовинами основа (картопляний настій) стимулює споруляцію плісняви та виробництво пігменту у деяких дерматофітів.

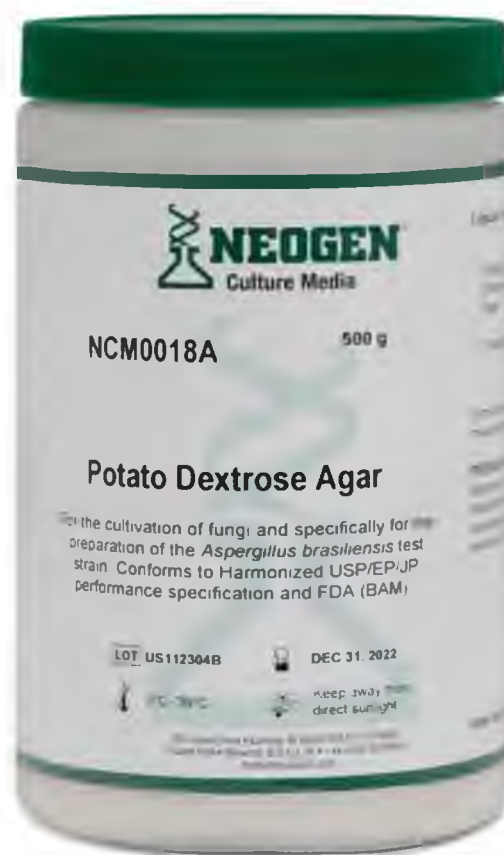


Рис. 1.6 Картопляно-декстрозний агар (PDA)

РДА складається з зневодненого картопляного настою та декстрази, які стимулюють пишне зростання грибів. Агар додається як загущуючий агент. У багатьох стандартних процедурах використовується певна кількість стерильної винної кислоти (10%) зниження рН цього середовища до $3,5 \pm 0,1$, що пригнічує зростання бактерій [39]. Хлорамфенікол діє як селективний агент для придушення надлишкового росту бактерій, що конкурують мікроорганізмів зі змішаних зразків, дозволяючи при цьому виділяти селективні гриби.

Процедура приготування картопляно-декстрозного агару (КДА)

Для приготування картопляного настою відваріть 200 г нарізаної картоплі неочищеної в 1 л дистильованої води протягом 30 хв.

Профільтруйте через марлю, зберігши осад, який є картопляним настоем (або використовуйте комерційну зневоднену форму).

Змішайте з декстрозою, агаром та водою і кип'ятіть до розчинення.

Автоклавуйте 15 хвилин при 121°C .

Розлийте порції по 20-25 мл у стерильні чашки Петрі розміром 15×100 мм.

Кінцевий рН – $5,6 \pm 0,2$.

1.4.4. Характеристика та склад глюкозо-пептон-дріжджового агару (GPYA)

GPYA (від англ. Glucose-Peptone-Yeast Agar - глюкозо-пептон-дріжджовий агар) або скорочено GPYA - живильне середовище для зростання дріжджів (рис.1.7). Містить дріжджовий екстракт, пептон, двічі дистильовану воду та декстразу. Може використовуватися як шільне середовище після додавання агар-агару. Дріжджовий екстракт містить усі амінокислоти, необхідні для росту [32].

Агаризована версія GPYA складається з (г/л): 25,0 глюкози, 3,0 дріжджового екстракту, 2,0 пептону, 1,0 K_2HPO_4 , 1,0 KH_2PO_4 , 0,25 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 20,0 агару [10].



Рис. 1.7 Глюкозо-пептон-дріжджовий агар (GYPYA)

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Місце проведення експериментальної частини роботи

Робота була виконана на базі лабораторії екстракції рослинної сировини та біоконверсії Державної установи “Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної Академії Наук” (рис.2.1.), під керівництвом старшого наукового співробітника, кандидата біологічних наук – Круподьорової Тетяни Анатоліївни, а також на базі кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики під керівництвом доктора біологічних наук, доцента – Бойко Ольги Анатоліївни.



Рис. 2.1. Державна установа “Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної Академії Наук”

2.2. Матеріали і методи проведення досліджень

Джерело базидіоміцетів. *Pleurotus eryngii* Quel. 2015 року був наданий Колекцією культур грибів (ІБК) Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного Національної академії наук України. Шток-культури підтримували на пивно-віскозно-агарових середовищах при 4°C.

Культивування міцелію на ґрунтовому середовищі-агар. Для визначення швидкості зростання було вибрано кілька середовищ: агар Чапека-Докса (CZA, Sigma Aldrich), агар солодового екстракту (MEA, Difco), картопляно-декстрозний агар (PDA, Difco), глюкозо-пептон-дріжджовий агар (GPYA), що складається з (г/л): 25,0 глюкози, 3,0 дріжджового екстракту, 2,0 пептону, 1,0 K_2HPO_4 , 1,0 KH_2PO_4 , 0,25 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та 20,0 агару. Підготовлені середовища автоклаували за 121°C протягом 20 хв. Середовища розливали в стерильні чашки Петрі діаметром 9 см. Чашки інокулювали міцеліальними агаровими дисками (діаметр - 5 мм) гриба, вирізаними з чашок Петрі з GPYA, за допомогою стерильного бору на стадії активного росту міцелію (рис.2.2.).

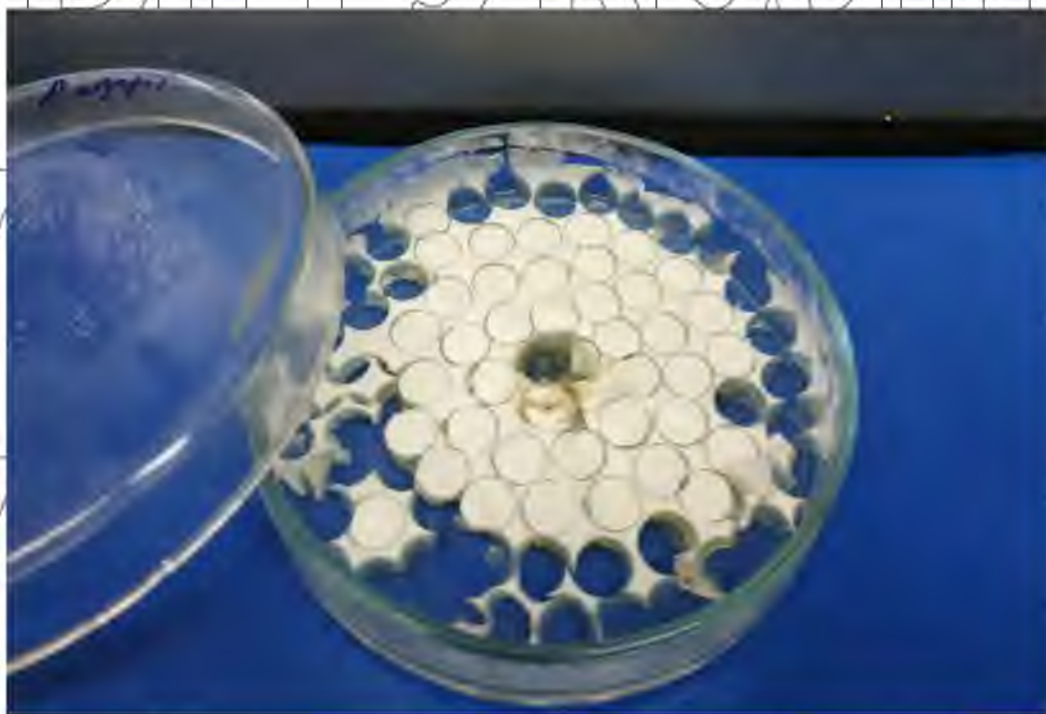


Рис. 2.2. Чашка Петрі з міцелієм *Pleurotus eryngii* після вилучення міцеліальних дисків

Культивування на твердому середовищі проводили за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ у темряві. Вегетативне зростання міцелію гриба на різних середовищах оцінювали шляхом вимірювання діаметра міцелію в чашці Петрі кожні 2 дні, доки гриб не покривав всю пластину (рис.2.3-2.4).



Рис. 2.3. Чашка Петрі з міцелієм *Pleurotus eryngii*



Рис. 2.4. Чашка Петрі з міцел'єм *Pleurotus eryngii*

Вплив періоду інкубації виробництва біомаси. Для дослідження зростання в динаміці використовували два рідкі середовища: GPY та натуральне середовище з 60 г амарантового борошна на 1 л H_2O . Основною природного середовища культивування служили відходи після CO_2 -екстракції борошна, виготовленої з зерен *Amaranthus hybridus* L. (далі - амарантове борошно). Вид *A. hybridus* був сортом "Ультра" (Миколаївська обл., Україна, 2011). Умови CO_2 -екстракції: тиск – 7,2 МПа; температура – $24^\circ C$; тривалість екстракції – 2 години.

Повністю колонізовані чашки Петрі з GPYA стерильно гомогенізували і використовували для 10% (v/v) інокуляції 250 мл колб з 50 мл відповідно рідкого середовища, стерилізованого автоклавуванням протягом 20 хв при $121^\circ C$, після чого занурювали культивування при $26 \pm 2^\circ C$ в ротатійному шейкері (120 об/хв).

Відділення та визначення біомаси. Міцелій відокремлювали від середовища шляхом фільтрації через фільтрувальний папір Whatman № 4.

Папір промивали дистильованою водою, висушували до постійної ваги при 105°C. Біомасу грибів оцінювали за абсолютно сухою вагою (a.d.w.).

Визначення екзополісахаридів. Культуральну рідину після занурювального культивування обробляли 96% етанолом в об'ємному співвідношенні 1:1 для отримання екзополісахаридів (EPS) залишали на ніч при 4°C. Осад (фракція полісахаридів) збирали центрифугуванням при 8000 g протягом 15 хв, а неочищений осад EPS висушували до постійної ваги при 60°C [42]. Екзополісахариди були відсутні в середовищі GPY. Однак вміст екзополісахаридів було визначено в борошні амаранту в слідових кількостях.

Вплив температури і початкового pH на виробництво біомаси. pH коригували за допомогою 1M HCl та 1M NaOH. Колби (150 мл) з 50 мл рідкого середовища стерилізували автоклавуванням протягом 20 хв при 121°C і потім інокулювали трьома міцеліальними пробками діаметром 8 мм, вирізаними з чашок Петрі з GPYA за допомогою стерильного бору на стадії активного росту міцелію. Гриби вирощували у вигляді статичних культур (без перемішування та у темряві) у колбах протягом 7 днів при температурі 26±2°C.

Глюкозо-аспарагінове середовище (г/л): 10,0 глюкози, 0,4 аспарагіну, 1,0 KH_2PO_4 , 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 л H_2O було використано для визначення оптимальних джерел вуглецю та азоту для зростання міцелію. У цьому середовищі глюкозу замінювали моносахаридами (арабіноза, фруктоза, галактоза, ксилоза), дисахаридами (мальтоза, сахароза), полісахаридом (розчинний крохмаль) та манітом у перерахунку на 12 г C/л (де чистий вуглець на літр розраховується за процентним вмістом вуглеводного елементу у молекулі). Різні концентрації арабінози (10, 15, 25, 30, 35 г) були розчинені в 1000 мл інглюкозо-аспарагінового середовища при pH 5,5.

Аналогічно аспарагін був замінений на різні джерела азоту (сульфат амонію, пептон, нітрат натрію, дріжджовий екстракт, сечовина) у кількості 0,21

г N/1 (де чистий азот на літр розраховується за процентним вмістом елемента азоту в молекулі).

Різні концентрації аспарагіну 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 г були розчинені у 1000 мл у глюкозі-аспарагіні при рН 5,5. Колби (150 мл) з 50 мл відповідно рідкого середовища стерилізували автоклавуванням протягом 20 хв при 121°C і потім інокулювали трьома міцеліальними пробками діаметром 8 мм, вирізаними з чашок Петрі з GRYA за допомогою стерильного бура на стадії активного росту міцелію. Гриби вирощували у вигляді статичних культур (без перемішування та у темряві) у колбах протягом 7 днів при температурі 26±2°C.

Антибактеріальна активність. Культури бактерій, *Bacillus subtilis* UCM B-901 (ATCC 6633), *Escherichia coli* UCM B-906 (ATCC 25922) та *Staphylococcus aureus* UCM B 4001 (ATCC 65388) були надані Українською колекцією мікроорганізмів. Досліджувані мікроорганізми культивували на агарі Мюллер-Хінтон (МНА) (37°C, 24 год). Кожен мікроорганізм суспендували в фізіологічному стерильному розчині і розводили до 10⁶ колонієутворюючих одиниць (КУО) на мл.

Антибактеріальну активність визначали методом дифузії агарових дисків 20. Стерильні паперові диски (діаметром 8 мм) з суспензією міцелію (подрібненого в нативний гомогенізований міцелій за допомогою ступки) або десятиразово випареною культуральною рідиною (за допомогою пісочної лазні) поміщали в чашки Петрі з МНА, попередньо інокульовані бактеріальними суспензіями. Інокульовані чашки Петрі інкубували протягом ночі при 37°C.

Антибактеріальну активність оцінювали шляхом вимірювання зони інгібування проти організмів, що тестуються (в мм, за допомогою лінійки, градуйованої до 0,5 мм). Антибактеріальну активність визначали за наявності зони інгібування більше 8 мм (що перевищує діаметр вставленого паперового диска). Як негативний контроль використовувалася дистильована вода.

Протигрибкова активність. Культури аскоміцетів: *Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev 301, *Candida albicans* (C.P.Robin) Berkhout 17/138 та клінічні штами *C. albicans* 311, 315, 319 були з колекції культур мікроорганізмів Інституту

епідеміології та інфекційних хвороб Національної академії медичних наук України. *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* та *Penicillium sp.* були взяті з Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин Інституту харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України. Шток-культури вирощували на картопляно-декстрозному агарі при 4°C.

Всі аскоміцети переносили з культур, що зберігаються, в чашки Петрі з КРІК і культивували при $26 \pm 1^\circ\text{C}$ для отримання міцеліальних колоній. У фазі активного росту культур вирізали міцеліальні диски *P. eryngii* діаметром 8 мм.

Досліджували пряму взаємодію грибів, що вивчаються, за їх здатністю пригнічувати зростання міцелію в подвійній культурі на PDA з використанням рейтингової шкали для 3 основних типів реакцій (А, В, С) і 4 підтипів (CA1, CB1, CA2 і CB2) за методом, описаним Badalyan, Innocenti & Garibyan [7].

Для визначення інгібування росту три диски переносили в 250 мл колби (рис. 2.5), що містять 50 мл живильного середовища GPY, і інкубували при $26 \pm 1^\circ\text{C}$ в статичних умовах.



Рис. 2.5 Ємності з глюкозо-пептон пріжджовим середовищем

Через 14 днів культивування поверхневий міцелій стерильно видаляли, а культуральну рідину змішували з раніше приготовленим та охолодженим до 40°C живильним середовищем GRYA у співвідношенні 1:1 (рис.2.6.).



Рис. 2.6. Інокульовані міцелієм колби

Отриману суміш (культуральну рідину з залишками міцелію, що виріс не на поверхні, а в середині середовища), розливали в чашки Петрі діаметром 45 мм. Після застигання середовища до центру чашки Петрі вносили один диск із мікроміцетами. Протигрибкову активність визначали на 7 день культивування за відсотком інгібування зростання відповідно до формули Вінсенту [37]. З огляду на особливості штаму *Penicillium* sp. до утворення численних дрібних колоній, ступінь інгібування його зростання оцінювали якісно: "-" немає інгібування, "+" слабе, "++" сильне інгібування зростання (зростання макроміцетів поверх культури патогену).

Статистичний аналіз. Усі експерименти проводилися у трьох повторностях. Дані аналізували за допомогою статистичних функцій Excel,

використовуючи програмне забезпечення Microsoft Office XP, Statistical Package for Social Sciences, Program 11.5 Version (SPSS, Inc., 2002). Значення представлені як середні, зі стандартною помилкою середнього (SEM).

Відмінності при $P \leq 0,05$ вважалися значущими.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РІСТ *P. ERYNGII*

3.1. Вплив культуральних середовищ на ріст *P. eryngii*

Підтримка чистої культури міцелію та дослідження його фізико-хімічних параметрів, необхідних для отримання високої продукції, є першим критичним етапом на шляху до успіху виробництва міцелію та вирощування грибів.

Необхідно враховувати, що для різних ізолятів та штамів одного і того ж виду грибів оптимальні умови росту можуть бути різними.

Зростання вегетативного міцелію та морфологія колоній є важливим критерієм характеристик культури для біотехнологічного застосування. Було визначено вплив поживних середовищ на швидкість зростання (рис. 3.1.) та морфологію колоній (табл. 3.1., рис. 3.2.) *P. eryngii*. Середня швидкість зростання міцелію на досліджених середовищах варіювала від $7,7 \pm 0,3$ до $12,6 \pm 0,6$ мм/день, при цьому найбільша швидкість зростання була отримана на середовищі CZA (рис. 3.1). Це середовище без агару також було більш придатним для виробництва біомаси *P. eryngii* в інших дослідженнях [17]. Проте ніжна, павукоподібна морфологія колоній через дуже тонкий міцелій виявилася незручною для подальшої роботи. Не було виявлено статистично значимих відмінностей у швидкості зростання міцелію на культуральних середовищах GPYA та PDA.

Однак дослідники повідомляли про різні середовища для оптимального зростання міцелію *P. eryngii*: глюкозо-пептон [3], дріжджовий солодовий екстракт [4], [39], [3], [32], грибний комплекс [3], [31], картопляно-декстрозний [25], [32].

Отримані нами результати значно кращі порівняно з іншими аналогічними експериментами зростання *P. eryngii* на MEA ($4,96-5,79$ мм/день), агарі з пшеничним екстрактом ($1,54-2,75$ мм/день), PDA ($1,68-3,04$ мм/день) [39], і на агарі з дріжджовим солодовим екстрактом ($0,7-4,2$ мм/день) [4].



Рис.3.1. Вплив культуральних середовищ на швидкість зростання *P. erugini*. CZA – Агар Чапека-Докса, MEA – Агар солодового екстракту, PDA – Картопляно-декстрозний агар, GPYA – Глюкозо-пептон-дріжджовий агар

Морфологія колоній *P. eryngii* на різноманітних культуральних середовищах

Таблиця 3.1

Культуральні середовища	Морфологія колоній				
	Колір	Форма/край	Ріст міцелію	Текстура	Поверхня
PDA	Білий	Кругла/фімбріозний	Розпростерта – повітряна	Ватна: достатньо довгі, одиночні гіфи міцелію, що поширюються у всіх напрямках	Плоска
GPYA	Білий та світло-жовтий в центрі колонії	Кругла/фімбріозний	Розпростерта – повітряна	Сизувата в центрі та бархатиста: щільний «килимок» з прямостоячих, прямих гіфів, зазвичай коротких	Плоска
CZA	Білий	Кругла/гладкий	Розпростерта	Павукоподібна з пластівцями в центрі колонії	Плоска
MEA	Світло-жовтий	Кругла/фімбріозний	Розпростерта – повітряна	Шерстистий: досить довгі переплетені гіфи чи групи гіфів, дещо матові, що нагадують вовняну тканину	Плоска



Рис. 3.2. Колонії *P. eryngii* на різноманітних культуральних середовищах:

a - PDA, b - GPYA, c - CZA, d – MEA

Особливий інтерес представляє вивчення закономірностей зростання грибів при глибинному культивуванні. Отримання біомаси грибів на стандартних та природних середовищах є дуже актуальним та перспективним напрямком у сучасній біотехнології.

Вивчено вплив живильного середовища на виробництво біомаси та екзополісахаридів *P. eryngii* при глибинному культивуванні. Отримані дані динаміки накопичення біомаси на двох використаних рідких середовищах підпорядковувалися загальним закономірностям розвитку мікроорганізму за умов глибинного культивування (рис. 3.3).

Результати дослідження показали, що максимальна кількість біомаси $15,3 \pm 0,2$ г/л та $14,5 \pm 0,8$ г/л була отримана на 8 день культивування на середовищі GPY та на 10 день культивування на середовищі з амарантовим борошном, відповідно. Однак виробництво ерих екзополісахаридів було краще встановлено на природному середовищі. Отримана кількість біомаси дещо краща за результати позитивного впливу 10-оксо-транс-8-деценної кислоти на ріст *P. eryngii* (10,2-12,6 г/л) на 12 день культивування [25] і значно перевищує результати (від 1,5 мг/мл до 2,7 мг/мл), отримані на різних середовищах при глибинному культивуванні зі струшуванням і без нього [22].

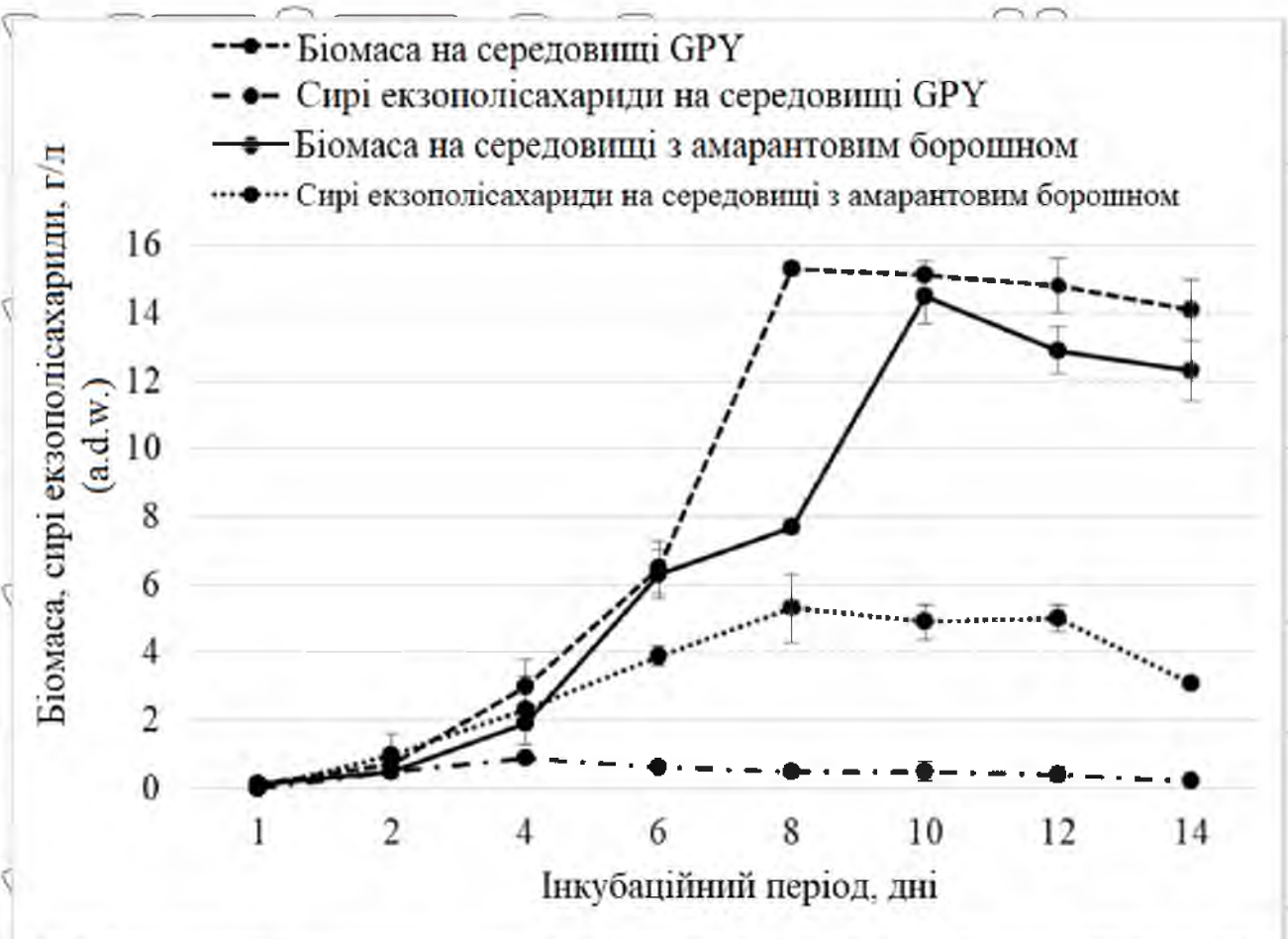


Рис. 3.3. Динаміка вироблення біомаси та сирих екзополісахаридів *P. eryngii* у колбах, що струшуються, на різних середовищах

3.2. Вплив температури та рівня pH на ріст *P. eryngii*

Добре відомо, що температура значно впливає на метаболічні реакції грибів. Оптимальна температура для вирощування *P. eryngii* становила $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (рис. 3.4). Наші результати узгоджуються з даними, що показали оптимальну температуру 20°C для вегетативного зростання *P. eryngii* [17]. В інших дослідженнях найбільш підходящими температурами для зростання міцелію були 25°C [4], [34], $25-30^\circ\text{C}$ [32], 30°C [20]. Повідомлялося, що різні штами *P. Eryngii* ростуть у широкому діапазоні температур ($^\circ\text{C}$): 10, 15, 20, 25, 30, де оптимальною температурою була визнана $20-30^\circ\text{C}$ залежно від штаму гриба та середовища культивування [23].

Структура та функція міцелію (зокрема, морфологія клітин, функція клітинних мембран, розчинність солей, поглинання необхідних поживних речовин) грибів суттєво залежить від рН вихідного середовища.

Встановлено, що міцелій *P. eryngii* може зростати у вивченому діапазоні значень рН із досить незначними відмінностями. Найкраще зростання було отримано при значеннях рН 5,0-5,5, оскільки ми не спостерігали статистично значущої різниці в зростанні міцелію при цих рН (рис. 3.5). Це спостереження узгоджується з даними Alam et al.⁴⁴ які встановили, що ріст *P. eryngii* в діапазоні рН від 5~9 без будь-яких значних змін. Деякі дослідження [31], [40], [3], [32] показали, що для штамів *P. eryngii* максимальне зростання міцелію було визначено при рН 6,0.

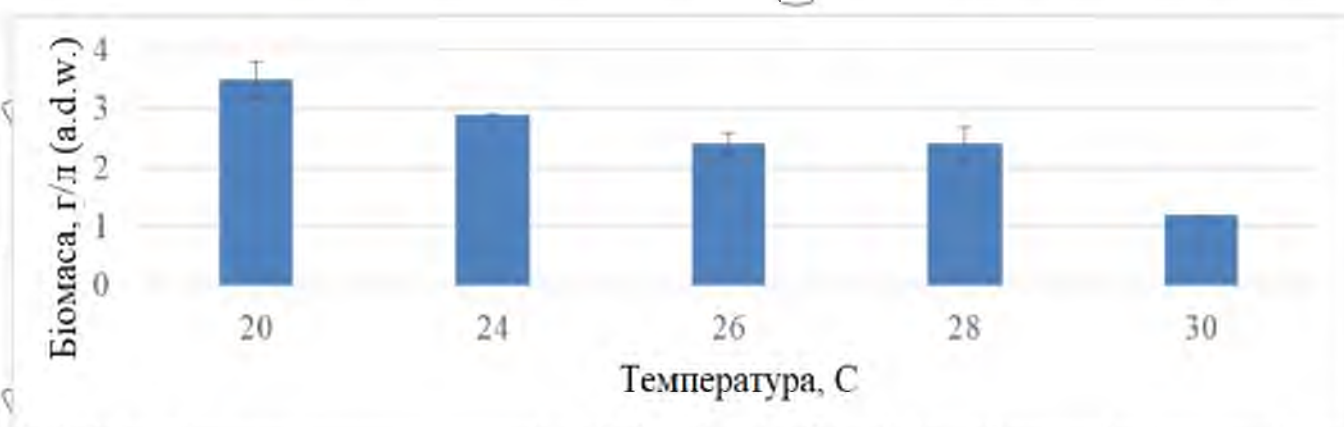


Рис. 3.4. Вплив температури на виробництво біомаси *P. Eryngii*

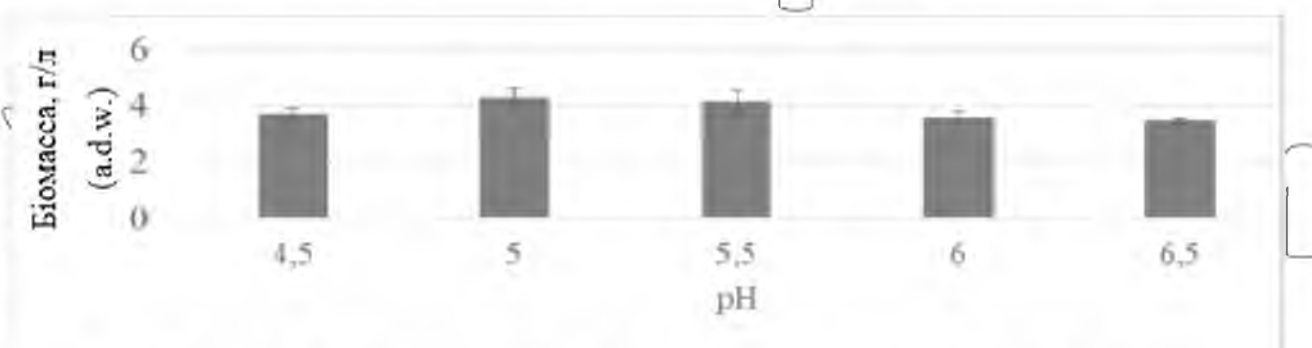


Рис. 3.5. Вплив вихідного рН на виробництво біомаси *P. eryngii*

Вивчення трофічних потреб необхідно для розуміння фізіології зростання грибів. Джерела вуглецю та азоту мають першорядне значення, оскільки вони відіграють важливу роль у процесах зростання та розвитку. Вуглець необхідний для синтезу речовин живих клітин та бере участь в окислювальних процесах, у яких він є єдиним джерелом енергії.

Наша робота показує, що *P. eryngii* може використовувати широкий спектр джерел вуглецю, таких як моносахариди, дисахариди та полісахариди (рис. 3.6). Але арабіноза в концентрації 20 г/л була найбільш відповідним джерелом вуглецю для біомаси *P. eryngii* (рис. 3.7). Цей результат узгоджується з екологією цього гриба, який є слабким паразитом, оскільки арабіноза є однією з поширених резервних речовин рослин сімейства *Asteraceae* (*Eryngium* spp. і *Ferula* spp.), на коренях яких природно росте *P. eryngii*. У попередніх звітах *P. eryngii* для зростання необхідні різні джерела вуглецю: декстрин, потім фруктоза, манноза і мальтоза [3], глюкоза (3-4%) і декстрин (5%) [20], крохмаль і сахароза [6].

Азотовмісні сполуки відіграють важливу роль у метаболізмі грибів. Серед джерел азоту, використаних у цьому дослідженні, аспарагін виявився найкращим джерелом азоту для біомаси *P. eryngii* (рис. 3.8). Встановлено, що аспарагін у концентрації 0,8-1,6 г/л підтримував синтез біомаси на тому самому рівні (рис. 3.9).

В іншому дослідженні [20] казамінокислота (0,12%) була найбільш відповідним джерелом азоту для зростання міцелію *P. eryngii*. Однак хороше зростання було отримано на середовищі з серином, глутаміновою кислотою, аспарагіном, аланіном та сечовиною. Ацетат амонію був виявлений для кращого зростання міцелію *P. eryngii*, за яким слідують аргінін та сечовина [3].

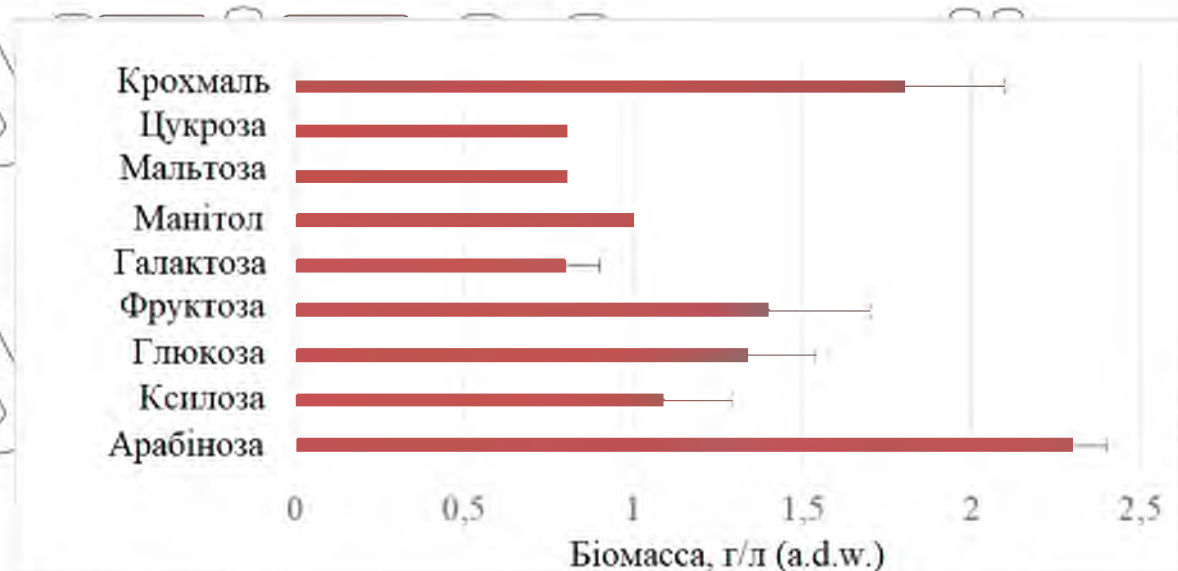


Рис. 3.6. Вплив джерел вуглеводу на виробництво біомаси *P. eryngii*



Рис. 3.7. Вплив концентрації арабінози на виробництво біомаси *P. eryngii*

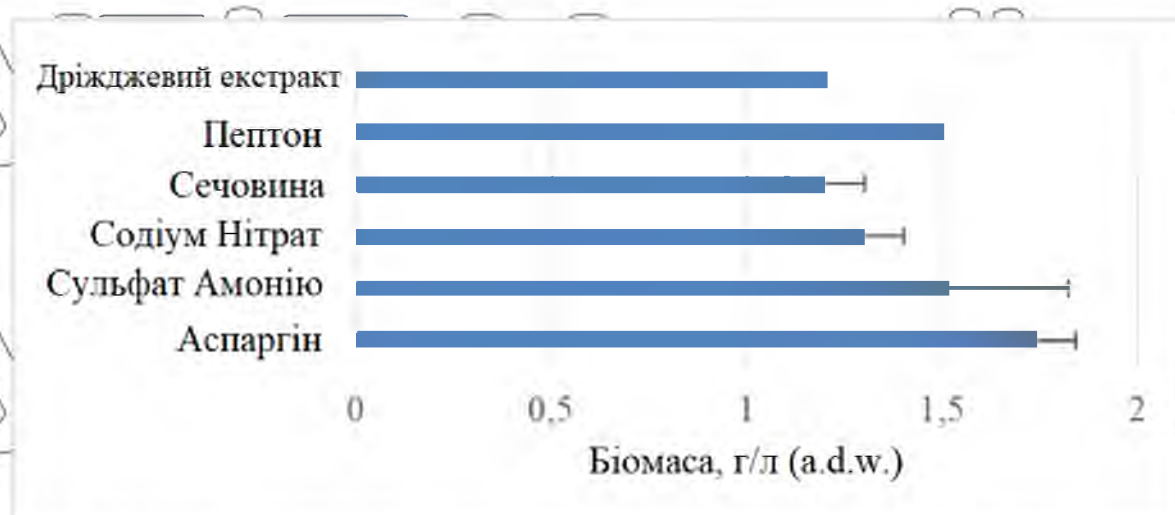


Рис. 3.8. Вплив джерел азоту на виробництво біомаси *P. eryngii*

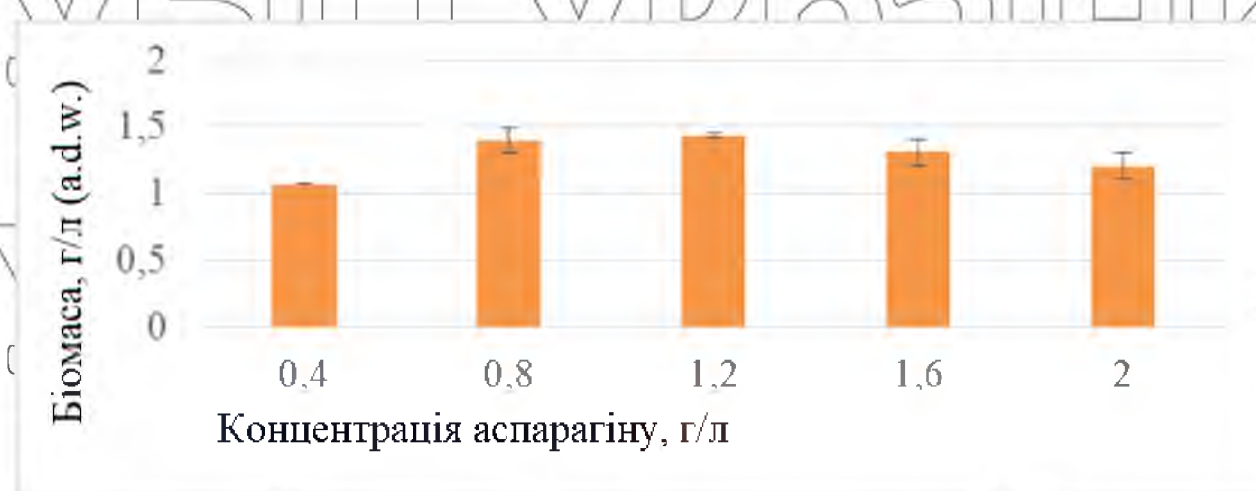


Рис. 3.9. Вплив концентрації аспарагіну на виробництво біомаси *P. Eryngii*

Таким чином, враховуючи результати проведених досліджень та аналіз літературних даних, основні потреби (температура, рН, джерела вуглецю та азоту) росту грибів є абсолютно специфічними для кожного штаму чи ізоляту. Розуміння фізіологічних потреб грибів та дотримання оптимальних умов їх культивування сприятиме отриманню їх високої продуктивності.

ВИСНОВКИ

1. Доведено, що середня швидкість росту міцелію на середовищах, що складаються з агару Чапека-Докса, агару солодового екстракту, картопляно-декстрозного агару, глюкозо-пептон-дріжджового агару, варіювала між $7,7 \pm 0,3$ та $12,6 \pm 0,6$ мм/день, при цьому найбільша швидкість була отримана на середовищі Чапека-Докса.
2. Встановлено вплив середовища культивування на зростання міцелію, морфологію колоній та прояв антибактеріальної активності.
3. Виявлено, що оптимальна температура становить 20°C та значення pH варіює між 5,0-5,5, присутність арабінози (концентрація - 20 г/л) та аспарагіну (концентрація 0,8-1,6 г/л) дали найкращі результати для синтезу біомаси *A. eryngii*, та його терапевтичний потенціал.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sonnenberg A.S.M., Visser M.H.M. & Hendrickx P.M., 2015. Evaluation of king oyster mushrooms strains (*Pleurotus eryngii*) on selective lignin degradation in wheat straw; Wageningen, the foundation Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek. Research Institute Praktijkonderzoek Plant & Omgeving / Plant Research International, Wageningen UR (University & Research centre), PPO/PRI report 2016.
2. Alam N, Yoon KN, Lee JS, Cho HJ, Shim MJ, et al. (2011) Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. *Saudi J Biol Sci* 18: 403-409.
3. Alam N, Shim M.J., Lee M.W., Shin P.G., Yoo Y.B. and Lee T.S. Vegetative Growth and Phylogenetic Relationship of Commercially Cultivated Strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology*. 2009. № 37 (4). P. 258-266.
4. Alavi A., Goltape E.M., Kashy A., Arzani K., Asadi E. Investigation on Cultivation of Wild King Oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii* DC. Fr. Quel) of Charmahal va Bakhtiary Province (Iran). *Proceedings of The Fourth International Iran & Russia Conference*. P. 692-696.
5. Alessandro Miceli, Alessandra Moncada, Leo Sabatino, Filippo Vetrano (2019) Effect of Gibberellic Acid on Growth, Yield, and Quality of Leaf Lettuce and Rocket Grown in a Floating System 2019, 9(7), 382.
6. Altaf S.A., Umar D.M., Muhammad M.S. Production of Xylanase Enzyme by *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes* Grown on Different Carbon Sources under Submerged Fermentation. *World Applied Sciences Journal* 8 (Special Issue of Biotechnology & Genetic Engineering). 2010. P. 47-49.
7. Badalyan S.M., Innocenti G., Garibyan N.G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea*. 2002. № 41 (3). P. 220-225.

8. Candidates For Cultivation: The King Oyster Mushroom [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://blog.freshcapmushrooms.com/learn/candidates-for-cultivation-the-king-oyster-mushroom>.

9. Chen J, Yong Y, Xing M, Gu Y, Zhang Z, et al. (2013) Characterization of polysaccharides with marked inhibitory effect on lipid accumulation in *Pleurotus eryngii*. Carbohydr Polym 97: 604-613

10. Cultivating King Oyster Mushrooms [Електронний ресурс]. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: <http://amgurumushrooms.blogspot.com/2015/10/cultivating-king-oyster-mushrooms.html>.

11. Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition) 2019, Pages 13-20.

12. Gupta R, Chakrabarty SK. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav.* 2013;8(9):e25504. doi:10.4161/psb.25504.

13. International Journal of Medicinal Mushrooms// DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v7.i3.700. – pages 429-430.

14. International Journal of Pharmaceutical Science Invention ISSN (Online): 2319 – 5718, ISSN (Print): 2319 – 670X www.ijpsi.org Volume 6 Issue 3, March 2017, PP. 19-25.

15. Islam, Mst & Khair, Abul & Islam, Md. (2009). Effect of growth regulators on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* on PDA at the optimum pH level. *South Asian J. Agric.* 4: 85-88.

16. J. Alvarez-Builla, J. J. Vaquero, J. Barluenga, (Eds) 2011, Modern Heterocyclic Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim; (b) I. A. Joule, K. Mills, 2010 Heterocyclic Chemistry, Wiley-Blackwell, Oxford.

17. Janpoor J., Pourianfar H.R., Shahtahmasebi S. Study on effect of culture medium and growth conditions on Liquid Spawn king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). *The International Journal of Farming and Allied Sciences*. 2017, № 6 (6). P. 154–156.

18. Jedinak A, Dudhgaonkar S, Wu QL, Simon J, Sliva D. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF- κ B and AP-1 signaling. *Nutr J*. 2011; 10: 52. Published 2011 May 16. doi:10.1186/1475-2891-10-52.

19. Jing X, Mao D, Geng L, Xu C (2013) Medium optimization, molecular characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii*. *Arch Microbiol* 195: 749-757.

20. Kim H.-K., Cheong J.-C., Chang H.-Y., Kim G.P., Cha D.-Y., Moon B.-J. The Artificial Cultivation of *Pleurotus eryngii* (I) Investigation of Mycelial Growth Conditions. *The Korean Journal of Mycology*. 1997. № 25(4). P. 305–310.

21. King Oyster Mushroom Grow Kit [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://growmushroomscanada.ca/product/king-oyster-mushroom-grow-kit>.

22. Mai J.-L., Ma J.-T. Effect of 10-oxo-trans-8-decenoic acid on Mycelial growth of *Pleurotus eryngii*. *Fungal Science*. 2002. № 17 (1, 2). P. 1–9.

23. Miyauchi, S., Kon, K., Yamachi, T. & Shimomura, M. Cultural characteristics of mycelial growth of *Pleurotus eryngii*. 1998. *Nippon. Kingakakai, Kaiho*. № 39 (3). P. 83–87.

24. Mori K, Kobayashi C, Tomita T, Inatomi S, Ikeda M (2008) Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake) and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein deficient mice. *Nutr Res* 28: 335-342.

25. Nguyen T.M. and Ranamukhaarachchi S.L. Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2020. № 23. P. 223–230.

26. Nutrition facts label for Mushroom, oyster, raw [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://nutritiondata.self.com/facts/vegetables-and-vegetable-products/3050/2>.

27. *Pleurotus eryngii* [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://www.mycobank.org/MB/170772>.

28. *Pleurotus eryngii*, King oyster mushroom, 杏鮑菇, エリンギ [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://www.medicalmushrooms.net/pleurotus-eryngii>.

29. *Pleurotus eryngii*: Health Benefits of The King Oyster Mushroom [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://healing-mushrooms.net/Pleurotus-eryngii>.

30. Richard Sullivan: University of Strathclyde; Medicinal Mushrooms – Their Therapeutic Properties, Richard Sullivan, May 2002.

31. Ryu J.-S., Kim M.-K., Kwon J.-H., Cho S.-H., Kim N.-K., Rho C.-W., Lee C.-H., Ro H.-S., Lee H.-S. The Growth Characteristics of *Pleurotus eryngii*. *The Korean Journal of Mycology*. 2007. № 35 (1). P. 47–53.

32. Sardar H., Ali M.A., Ayyub C.M., Ahmad R. Effects of different culture media, temperature and pH levels on the growth of wild and exotic *Pleurotus* species. *Pakistan Journal of Phytopathology*. 2015. № 27 (02). P. 139–145.

33. Source: PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

34. Soylu M.K., Boztok K., Esiyok D. Mycelial growth performance of the *Pleurotus eryngii* species complex strains on different temperatures. *ISHS Acta Horticulturae 1123: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): International Symposium on High Value Vegetables, Root and Tuber Crops, and Edible Fungi Production, Supply and Demands*. DOI: 10.17660/ActaHort.2016.1123.29.

35. Sun, T.P. Gibberellin Signal Transduction in Stem Elongation & Leaf Growth. In *Plant Hormones*; Davis, P.J., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2004; pp. 308–328.

36. The IBK mushroom culture collection. (2016). Bisko N.A, Lomborg M.L., Myropolska N.Y., Mykchaylova O.B. National Academy of Sciences of the Ukraine. Kyiv, Alterpres. 120 p.

37. Vincent J.M. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature*. 1947. № 159. 850 p. DOI: 10.1038/159850b0.

38. Wang H, Ng TB (2001) Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 750-755.

39. Zăgrean V, Sbîrciog G., Buzatu M.-A., Mândru I. Effect of Nutritive Media and pH on Mycelial Growth of some *Pleurotus eryngii* Strains in vitro. *Bulletin UASVM Horticulture*. 2016. № 73 (2). P. 276–278.

40. Zăgrean V., Sbîrciog G., Buzatu M.-A., Mândru I. Effect of Nutritive Media and pH on Mycelial Growth of some *Pleurotus eryngii* Strains in vitro. *Bulletin UASVM Horticulture*. 2016. №73 (2). P. 276–278.

41. Zhiming Fu, Liu Y, Zhang Q (2016) A Potent Pharmacological Mushroom: *Pleurotus eryngii*. *Fungal Genom Biol* 6: 139. doi: 10.4172/2165-8056.1000139.

42. Бабицкая В.Г. Базидиальные грибы – субстратия для получения функциональных препаратов. *Материалы международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии»*. Минск, 2004. С. 230–232.

43. Королевская вешенка: выращивание, фото [Электронный ресурс]. 2019. – Режим доступа до ресурсу: <https://agrartex.ru/ovoshhi/korolevskaya-veshenka-vyrashhivanie-foto.html>.

44. Королівська глива вирощування, фото [Електронний ресурс]. – 2020. – Режим доступа до ресурсу: <https://vehatinfo.biz.ua/korolivska-gliva-viroshhuvannja-foto-sajt-pro>.

45. Бисёко Н.А., Дудка И.А. //Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка, 1987.

46. Шнырева А.А. Грибы рода *Pleurotus*: генотипирование и анализ локусов половой совместимости /Анастасия Андреевна Шнырева. //М.: Национальная академия микологии – Медицина для всех. – 2003. – С. 7–8.

47. Staji M., Vukojevi J. and Duleti-Lauševi S. Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009. № 29 (1). P. 55–66. DOI: 10.1080/07388550802688821.

48. Yamaç M., Bilgili F. Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharmaceutical Biology*. 2006. № 44 (9). P. 660–667. DOI: 10.1080/13880200601006897.

49. Краснопольская Л.М., Тренин А.С., Бычкова С.П., Цвигун Е.А., Джавахян Б.Р. Погруженная культура *Pleurotus eryngii*: антибиотические свойства и способность к образованию ингибиторов биосинтеза стеролов. *Universum: Химия и биология*. 2015. № 11 (18). URL: <http://universum.com/ru/nature/archive/item/2703>.

50. Atila F. Determining the Effects of Container Types on Yield and Fruitbody Features of *Pleurotus eryngii* Strains. *International Journal of Crop Science and Technology*. 2017. № 3 (1). P. 7–14.

51. Soylu M K., Boztok K., Esiyok D. Mycelial growth performance of the *Pleurotus eryngii* species complex strains on different temperatures. *ISHS Acta Horticulturae 1123: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): International Symposium on High Value Vegetables, Root and Tuber Crops, and Edible Fungi Production, Supply and Demands*. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1123.29.