

Міністерство охорони здоров'я України
ДНТ "Львівський національний університет імені Данила Галицького"

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Корабель Іван Михайлович

УДК:547.917.002.33:001.8

**ПОШУК СИРОВИННИХ ДЖЕРЕЛ СКВАЛЕНУ
І ЇХ КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

_____ І.М. Корабель

Науковий керівник: Антонюк Володимир Олександрович,
доктор фармацевтичних наук, професор

Львів – 2026

АНОТАЦІЯ

Корабель І.М. Пошук сировинних джерел сквалену і їх комплексне дослідження – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 – Фармація, промислова фармація, (22 – Охорона здоров'я) – ДНТ "Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького" МОЗ України, Львів, 2026.

Дисертаційна робота присвячена пошуку нових сировинних джерел сквалену і дослідженню рослинної та грибнової сировини на вміст сквалену та розробці методів комплексного одержання інших біологічно-активних сполук з цієї сировини.

Сквален — це ациклічний тритерпен, присутній в організмі людини в якості проміжної ланки в біосинтезі холестерину і інших сполук. Проявляє антиоксидантні, протизапальні, антиканцерогенні, кардіозахисні та ряд інших властивостей. Використовується в медицині і в косметології. Сквален також використовується як ад'ювант у вакцинах, що стимулює імунну відповідь і збільшує реакцію пацієнта на вакцину. Його додають до ліпідних емульсій при виготовленні вакцин.

Найбагатшим джерелом одержання сквалену є жир з печінки глибоководних акул, де його вміст може сягати 60 – 90 %. Щорічно для добування сквалену виловлюють від трьох до шести мільйонів глибоководних акул. В період пандемії Covid-19 зріс попит на сквален у зв'язку з активними розробками і впровадженнями протиковідних вакцин зі скваленовмісним ад'ювантом. Це викликало стурбованість у природоохоронних організацій, так як приводило до збільшення вилову глибоководних акул, кількість яких і так суттєво зменшилася в останні роки. Екологічні та ряд інших проблем по вилову акул збільшили зацікавленість по отриманню сквалену з інших джерел.

Як альтернативне джерело для одержання сквалену є жирні олії з насіння рослин. Однією з найбагатших на сквален олією вважається олія з насіння амаранту, де вміст сквалену може сягати 5 – 8 %. В інших рослинних оліях вміст нижчий, і рідко перевищує 1 %.

Можливість заміни сквалену тваринного походження на сквален рослинного походження в препаратах для внутрішнього застосування, особливо в якості ад'юванта для вакцин, підтверджується рядом досліджень.

На основі аналізу літературних джерел і власних досліджень окреслено основний напрямок в пошуку сировинних джерел серед вищих грибів відділу *Basidiomycota*, класу *Agaricomycetes*. Переважно досліджувані нами гриби являються ксилотрофами — це дереворуйнівні гриби, які є важливим компонентом біоценозів.

У дисертаційній роботі досліджено плодові тіла 21-го виду базидіомікотових, переважно дикорослих грибів зібраних у Сколівських Бескидах, 20 видів яких належать до класу *Agaricomycetes*, а один вид класу *Pezizomycetes*.

У роботі використовували також насіння та надземну частину щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.), що вирощували на присадибній ділянці у Львові протягом 2020 – 2025 рр.

Для виявлення та кількісного визначення сквалену у сировині використовували різноманітні фізико-хімічні методи аналізу: ТШХ на пластинках силікагелю, рідинну хроматографію на колонках силікагелю, ГХ-МС, УФ-спектроскопію, рефрактометрію. Для ідентифікації та кількісного визначення біологічно-активних речовин у сировині, що вміщувала сквален також використовували окрім згаданих методів аналізу, віскозиметрію, йодометрію, гравіметрію, ІЧ-спектроскопію та різноманітні методи хроматографії: ВЕРХ, іонообмінну, гель-хроматографію, афінну хроматографію.

Кожен експеримент проводили не менше, як у трьох повтореннях. Статистичну обробку виконували за допомогою пакету статистичних функцій "Microsoft Excel", з урахуванням середніх арифметичних величин та стандартної похибки середнього арифметичного. Дані були статистично обраховані за допомогою t-критерію Стьюдента, а значення $p \leq 0,05$ вважалося статистично достовірними.

У результаті проведеної роботи нами розроблена комплексна методика отримання ліпофільних, водних і спиртових екстрактів, з одного зразка сировини плодів шириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) в один технологічний цикл. Досліджено вміст біологічно-активних речовин в даних екстрактах. Розроблені методики виділення і очищення сквалену з ліпофільних екстрактів, лектину з водних екстрактів і суми тритерпенових речовин зі спиртових екстрактів. Розроблена оптимальна схема почерговості екстракцій для найбільш раціонального використання сировини з максимальним виходом найбільш цінних біологічно-активних речовин в один технологічний цикл.

Розроблена методика отримання біологічно-активних речовин з надземної частини шириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.), яка залишається після одержання насіння. Досліджено вміст біологічно-активних речовин в водних екстрактах надземної частини шириці хвостатої і розроблена методика розділення цих речовин методом колонкової рідинної хроматографії на пігмент амарантин, білкові і полісахаридні фракції. Досліджено вміст біологічно-активних речовин в спиртових екстрактах і їх розділення на фракції.

Проаналізовано 20 видів грибів класу *Agaricomycetes* і один вид класу *Pezizomycetes* на вміст сквалену і інших біологічно-активних речовин, як потенційних сировинних джерел сквалену. Із проаналізованих зразків виділені найбільш перспективні види для подальших досліджень, такі як: *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst. та *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.. Розроблені методики виділення і очищення сквалену з досліджуваних

зразків грибів. Досліджено динаміку змін вмісту сквалену та інших біологічно-активних речовин в плодових тілах залежно від їх стадії зрілості. Встановлено, що на ранніх стадіях зрілості вміст сквалену найбільший.

Досліджено вміст біологічно-активних речовин в ліпофільних екстрактах плодових тіл їстівних видів роду Дошовик (*Lycoperdon*) і отруйного виду Дошовик несправжній (*Scleroderma aurantium* (L.) Pers.). Встановлено що в ліпофільному екстракті *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. відсутні потенційно небезпечні речовини в значній кількості, що дозволяє використовувати цей вид для добування сквалену з ліпофільних екстрактів.

Проведені детальні дослідження видів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. і *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, як одних з найбільш перспективних джерел сквалену з грибів класу *Agaricomycetes*. Розроблені методики отримання ліпофільних, водних та спиртових екстрактів з плодових тіл цих грибів. Досліджено динаміку змін вмісту біологічно-активних речовин в плодових тілах даних грибів на різних стадіях зрілості. Для *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. проведено порівняльний аналіз вмісту біологічно-активних речовин для дикорослих і культивованих форм. Встановлено, що культивовані форми містять суттєво менше сквалену, ніж дикорослі форми, що піднімає питання по вивченню оптимальних умов проростання плодових тіл для збільшення виходу сквалену з сировини. Крім того, культивовані плодові тіла *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, вирощені у прохолодних приміщеннях без попадання сонячного світла, майже не містили жиророзчинних вітамінів E та D.

Проведені дослідження на вміст хітину у вичавках з плодових тіл грибів, який залишається після попередніх екстракцій в рамках комплексного використання сировини. Розроблені методики виділення і очищення хітину з плодових тіл видів: *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Lycoperdon perlatum* Pers. та *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui. Проведено визначення молекулярної маси і ІЧ-

спектроскопію отриманого хітину. Зроблено висновок, що вміст хітину у плодових тілах невисокий, його екстракція потребує використання сильних кислот або агресивних розчинників при низьких температурах. При цьому спостерігається його гідроліз. Більш раціональним є екстракція з вичавок плодових тіл грибів хітозану у лужному середовищі. Однак одержання грибного хітозану є доцільним лише при комплексному використанні вичавок з плодових тіл. Одержаний грибний хітозан відрізняється від хітозану креветок меншою молекулярною масою, ступенем деацетилювання та наявністю домішок фенольної та вуглеводної природи.

Проведені дослідження по збільшенню вмісту сквалену в плодових тілах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. внаслідок інгібування скваленоксидази тербінафіном гідрохлоридом. Розроблені методики по культивуванню грибів даного виду за різних умов. Досліджено вміст біологічно-активних речовин в ліпофільних екстрактах досліджуваних і контрольних зразках культивованих грибів за різних умов. Встановлено, що таким способом можна отримати в рази більший вихід сквалену на 100 г. сухої сировини ніж з найбільш поширеного рослинного джерела сквалену роду щириці (*Amaranthus*).

Методами ГХ-МС проаналізовано вміст біологічно-активних речовин в ліпофільних і спиртових екстрактах щириці хвостатої і 21 виду грибів в тому числі на різних стадіях зрілості, і в плодових тілах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. зі збільшеним вмістом сквалену внаслідок інгібування скваленоксидази. Розроблена нами методика інгібування скваленоксидази тербінафіном гідрохлоридом може бути використана для збільшення кількості сквалену у плодових тілах інших базидіомікотових грибів.

За результатами дисертації опубліковано 12 наукових робіт, з них: 5 статей в наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Scopus і Web of Science, 5 тез доповідей на науково-практичних конференціях і 2 патенти на корисну модель.

Ключові слова: *Amaranthus caudatus*, плоди, гриби, екстракти, сквален, жиророзчинні вітаміни, лектин, фенольні сполуки, флавоноїди, хітин, ТШХ, рідинна хроматографія, ВЕРХ, газова хроматографія, ГХ-МС.

ABSTRACT

Korabell.M. Search for raw materials sources of squalene and their comprehensive study – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty

226 – Pharmacy, industrial pharmacy, (22 – Health care) – DNP "Danylo Halytsky Lviv National Medical University" Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2026.

The dissertation is devoted to the search for new raw materials for squalene and the study of plant and mushroom raw materials for squalene content and the development of methods for the complex production of other biologically active compounds from this raw material.

Squalene is an acyclic triterpene present in the human body as an intermediate in the biosynthesis of cholesterol and other compounds. It exhibits antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, cardioprotective and a number of other properties. It is used in medicine and cosmetology. Squalene is also used as an adjuvant in vaccines, which stimulates the immune response and increases the patient's response to the vaccine. It is added to lipid emulsions in the manufacture of vaccines.

The richest source of squalene is fat from the liver of deep-sea sharks, where its content can reach 60-90%. Every year, from three to six million deep-sea sharks are caught to extract squalene. During the Covid-19 pandemic, the demand for squalene increased due to the active development and implementation of anti-Covid vaccines with squalene-containing adjuvant. This caused concern among environmental organizations, as it led to an increase in the catch of deep-sea sharks, the number of which has already decreased significantly in recent years. Environmental and a number of other problems with shark fishing have increased interest in obtaining squalene from other sources.

An alternative source for obtaining squalene are fatty oils from plant seeds. One of the richest in squalene is amaranth seed oil, where the squalene content can reach 5-8%. In other vegetable oils, the content is lower, and rarely exceeds 1%.

The possibility of replacing squalene of animal origin with squalene of plant origin in preparations for internal use, especially as an adjuvant for vaccines, is confirmed by a number of studies.

Based on the analysis of literary sources and our own research, the main direction in the search for raw materials among higher fungi of the *Basidiomycota* department, class *Agaricomycetes*, has been outlined. The fungi we study are mainly xylophages - these are wood-destroying fungi, which are an important component of biocenoses.

In the dissertation work, the fruiting bodies of 21 species of basidiomycotic, mainly wild mushrooms collected in the Skoli Beskids, 20 species of which belong to the *Agaricomycetes* class, and one species to the *Pezizomycetes* class, have been studied.

The work also used seeds and aerial parts of *Amaranthus caudatus* L., which were grown on a homestead in Lviv during 2020-2025.

A variety of physicochemical analysis methods were used to detect and quantify squalene in the raw material: TLC on silica gel plates, liquid chromatography on silica gel columns, GC-MS, UV spectroscopy, refractometry. In addition to the aforementioned analysis methods, viscometry, iodometry, gravimetry, IR spectroscopy and various chromatography methods were also used to identify and quantify biologically active substances in the raw material containing squalene: HPLC, ion exchange, gel chromatography, affinity chromatography.

Each experiment was performed in at least three repetitions. Statistical processing was performed using the statistical functions package "Microsoft Excel", taking into account the arithmetic mean and the standard error of the arithmetic mean. The data were statistically calculated using the Student's t-test, and the value $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

As a result of the work, we developed a comprehensive method for obtaining lipophilic, aqueous and alcoholic extracts from one sample of raw materials of *Amaranthus caudatus* L. fruits in one technological cycle. The content of biologically active substances in these extracts was studied. Methods for the isolation and purification of squalene from lipophilic extracts, lectin from aqueous extracts and the sum of triterpene substances from alcoholic extracts were developed. An optimal extraction sequence scheme has been developed for the most rational use of raw materials with the maximum yield of the most valuable biologically active substances in one technological cycle.

A method has been developed for obtaining biologically active substances from the aerial part of *Amaranthus caudatus* L., which remains after obtaining seeds. The content of biologically active substances in aqueous extracts of the aerial part of *Amaranthus caudatus* was studied and a method for separating these substances by column liquid chromatography into amaranthine pigment, protein and polysaccharide fractions was developed. The content of biologically active substances in alcohol extracts and their separation into fractions were studied.

20 species of mushrooms of the *Agaricomycetes* class and one species of the *Pezizomycetes* class were analyzed for the content of squalene and other biologically active substances as potential raw materials for squalene. From the analyzed samples, the most promising species for further research were selected, such as: *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst. and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.. Methods for the isolation and purification of squalene from the studied mushroom samples were developed. The dynamics of changes in the content of squalene and other biologically active substances in fruit bodies depending on their stage of maturity was studied. It was established that the squalene content is highest in the early stages of maturity.

The content of biologically active substances in lipophilic extracts of fruit bodies of edible species of the genus *Lycoperdon* and the poisonous species

Scleroderma aurantium (L.) Pers.) was studied. It was established that the lipophilic extract of *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. does not contain potentially hazardous substances in significant quantities, which allows using this species for the extraction of squalene from lipophilic extracts.

Detailed studies of the species *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. and *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui were conducted, as some of the most promising sources of squalene from fungi of the *Agaricomycetes* class. Methods for obtaining lipophilic, aqueous and alcoholic extracts from the fruiting bodies of these fungi were developed. The dynamics of changes in the content of biologically active substances in the fruiting bodies of these fungi at different stages of maturity was studied. For *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. a comparative analysis of the content of biologically active substances for wild and cultivated forms was conducted. It was found that cultivated forms contain significantly less squalene than wild forms, which raises the question of studying the optimal conditions for germination of fruit bodies to increase the yield of squalene from raw materials. In addition, cultivated fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, grown in cool rooms without sunlight, contained almost no fat-soluble vitamins E and D.

Studies have been conducted on the chitin content in the fruiting bodies of mushrooms, which remains after previous extractions within the framework of the complex use of raw materials. Methods have been developed for the isolation and purification of chitin from the fruiting bodies of the following species: *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Lycoperdon perlatum* Pers. and *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui. The molecular weight and IR spectroscopy of the obtained chitin have been determined. It has been concluded that the chitin content in the fruiting bodies is low, its extraction requires the use of strong acids or aggressive solvents at low temperatures. In this case, its hydrolysis is observed. It is more rational to extract chitosan from the fruiting bodies of mushrooms in an alkaline medium. However,

the production of mushroom chitosan is expedient only with the complex use of fruiting bodies. The obtained mushroom chitosan differs from shrimp chitosan in its lower molecular weight, degree of deacetylation and presence of impurities of phenolic and carbohydrate nature.

Studies were conducted on increasing the squalene content in the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. due to inhibition of squalene epoxidase by terbinafine hydrochloride. Methods for cultivating mushrooms of this species under different conditions were developed. The content of biologically active substances in lipophilic extracts of the studied and control samples of cultivated mushrooms under different conditions was studied. It was established that in this way it is possible to obtain a much higher yield of squalene per 100 g. of dry raw material than from the most common plant source of squalene of the *Amaranthus* genus.

GC-MS methods were used to analyze the content of biologically active substances in lipophilic and alcoholic extracts of oyster mushroom and 21 species of mushrooms, including those at different stages of maturity, and in the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. with an increased content of squalene due to inhibition of squalene epoxidase. The method of inhibition of squalene epoxidase by terbinafine hydrochloride developed by us can be used to increase the amount of squalene in the fruiting bodies of other basidiomycotic fungi.

Based on the results of the dissertation, 12 scientific works were published, including: 5 articles in scientific publications indexed in the Scopus and Web of Science databases, 5 abstracts of reports at scientific and practical conferences and 2 patents for a utility model.

Keywords: *Amaranthus caudatus*, fruits, fungi, extracts, squalene, fat-soluble vitamins, lectin, phenolic compounds, flavonoids, chitin, TLC, liquid chromatography, HPLC, gas chromatography, GC-MS.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті

Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2022). Obtaining biologically active substances from *Amaranthus caudatus* L. seeds in one technological cycle. *Biomedical chromatography*, 36(8), e5386.

<https://doi.org/10.1002/bmc.5386> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)

Korabel, I., Khomyak, S., Panchak, L., & Antonyuk, V. (2023). Study of the Quantitative and Qualitative Changes in Chitin at Different Stages of Ripening of Mushroom Fruiting Bodies. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 28, 34-45. <https://doi.org/10.15259/PCACD.28.004> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)

Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Squalene in fruiting bodies of true mushrooms changes in the process of vegetation. *Italian Journal of Mycology*, 54, 1-11. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/19781> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)

Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., Vrubel, O. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Study of lipophilic substances of *Laetiporus sulphureus* (Bull. Fr) Murril at different stages of maturity of mushroom fruiting bodies. *Biomedical Chromatography*, 39(7), e70140. <https://doi.org/10.1002/bmc.70140> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)

Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Study of the chemical composition of the lipophilic extract of fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. *Asian Journal of Mycology*, 8(1): 156–164

DOI:10.5943/ajom/8/1/11 (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку)

Тези доповідей

Panchak L. V., Korabel' I. M., Zyn'A. R., Antonyuk V. O. Comparison of the chemical composition of lipophilic extracts of *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. and *Scleroderma aurantiacum* L. ex Pers. Phytochemical Society of Europe Meeting 2022, September 19-22, Jasi, Romania, p. 160. (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)

Korabel' I. M., Panchak L. V., Zyn'A. R., Antonyuk V. O. Purification of fatty oil, lectin and a fraction rich in triterpenoids from the seeds of *Amaranthus caudatus* in one technological cycle. Phytochemical Society of Europe Meeting 2022, September 19-22, Jasi, Romania, p. 216. (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)

Корабель І.М., Хом'як С.В., Панчак Л.В., Антонюк В.О. Кількісні та якісні зміни хітину на різних стадіях вегетації грибів-базидіоміцетів. V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" 14 квітня 2023 р. Харків, с. 119-120. (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)

Панчак Л.В., Корабель І.М., Врубель О.Р., Антонюк В.О. Дослідження водорозчинних полісахаридів плодових тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui, зібраних на різних стадіях їх розвитку. VII Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" 11 квітня 2025 р. Харків: НФаУ, с. 170-

172. *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)*

Корабель І.М., Антонюк В.О. Комплексне використання надземної частини *Amaranthus caudatus*. X Міжнародна науково-практична конференція "Science of post-industrial society: globalization and transformation processes" 06 березня 2026 р. Вінниця, Україна - Відень, Австрія. с. 875-876. *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)*

Патенти на корисну модель

Корабель І.М., Салабай С.І., Антонюк В.О. Спосіб одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів. / Патент України на корисну модель. № 126361, опубл. 11.06.2018, бюл. №11, 3 с. (Додаток В) *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку)*

Корабель Іван Михайлович, Панчак Лідія Володимирівна, Антонюк Володимир Олександрович. Спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) / Патент України на корисну модель №148769, опубл. 15.09.2021, бюл. № 37, 5 с. (Додаток Г) *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку)*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1. СКВАЛЕН: ВЛАСТИВОСТІ, ОТРИМАННЯ, ВИКОРИСТАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	28
1.1. Фізико-хімічні властивості сквалену.....	28
1.2. Природні джерела сквалену.....	29
1.2.1. В організмах тварин.....	29
1.2.2. Рослинна сировина.....	30
1.2.3. Мікроорганізми.....	32
1.2.4. Гриби, як джерело сквалену.....	33
1.2.4.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm. (<i>Basidiomycota</i> , <i>Agaricomycetes</i> , <i>Agaricales</i>).....	34
1.2.4.2. <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murril (<i>Aphyllophorales</i> , <i>Polyporaceae</i>).....	36
1.3. Хімічний синтез сквалену (недоліки і переваги над одержанням із природніх джерел).....	37
1.4. Біосинтез сквалену і його подальші перетворення.....	38
1.5. Речовини, що впливають на вміст сквалену.....	40
1.6. Використання сквалену в медицині.....	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	43
2.1. Загальна методологія досліджень.....	43
2.2. Сировина.....	44
2.3. Апаратура.....	45
2.4. Розчинники, реактиви, буферні розчини.....	46
2.5. Тонкошарова і колонкова рідинна хроматографія.....	46
2.6. Газова хроматографія-мас-спектрометрія.....	48
2.7. Визначення молекулярної маси за допомогою віскозиметра.....	49

2.8. Титриметричний метод визначення йодного числа.....	49
2.9. Визначення ензиматичної активності глікозидаз у плодovих тілах грибів.....	50
2.10. Статистичний аналіз.....	50
РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ЩИРИЦІ ХВОСТАТОЇ (AMARANTHUSCAUDATUS).....	
3.1. Мета дослідження.....	52
3.2. Розробка комплексної схеми отримання біологічно-активних речовин з насіння <i>Amaranthus caudatus</i> L. за один технологічний цикл.....	52
3.2.1. Виявлені складнощі в методах отримання сквалену і лектину в один технологічний цикл.....	53
3.2.2. Екстракція амарантової олії з насіння та очищення сквалену.....	53
3.2.3. Виявлені складнощі в методах отримання лектину і тритерпенових сполук в один технологічний цикл.....	54
3.2.4. Вибір оптимального екстрагенту для тритерпенових сполук.....	55
3.2.5. Отримання есцину.....	56
3.2.6. Визначення вмісту тритерпенових сполук.....	56
3.2.7. Пошук оптимальної схеми для екстракції лектину і тритерпеноїдів.....	59
3.2.8. Екстракція лектину.....	60
3.2.9. Аналіз лектину.....	61
3.2.10. Екстракція тритерпенових речовин.....	63
3.2.11. Ідентифікація сквалену і тритерпеноїдів за допомогою ГХ-МС.....	64
3.3. Розробка методики отримання біологічно-активних речовин з надземної частини <i>Amaranthus caudatus</i> L., яка залишається після одержання насіння.....	66
3.3.1. Екстракція пігменту амарантину і полісахаридів.....	67
3.3.2. Екстракція хлорофілів і флавоноїдів.....	67

Висновки до розділу 3.....	68
----------------------------	----

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ПЛОДОВИХ ТІЛ ГРИБІВ ЯК

ПОТЕНЦІЙНИХ СИРОВИННИХ ДЖЕРЕЛ СКВАЛЕНУ.....	70
4.1. Мета дослідження.....	70
4.2. Збір сировини.....	72
4.3. Приготування екстракту.....	73
4.4. Розділення екстракту на фракції колоноковою рідинною хроматографією.....	74
4.5. Підтвердження наявності сквалену.....	74
4.6. Результати досліджень.....	74
4.7. Водні екстракти грибів.....	81
4.8. Порівняння хімічного складу ліпофільних екстрактів <i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff. та <i>Scleroderma aurantium</i> (L.) Pers.....	84
4.9. Дослідження <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill і <i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) В.К. Суї на вміст амінокислот.....	86
Висновки до розділу 4.....	88

РОЗДІЛ 5. ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ НА РІЗНИХ

СТАДІЯХ ЗРІЛОСТІ ПЛОДОВИХ ТІЛ <i>LAETIPORUS SULPHUREUS, PLEUROTUS OSTREATUS, FOMITOPSIS BETULINA</i>.....	90
5.1. Дослідження <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill.....	90
5.1.1. Збір сировини <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill.....	90
5.1.2. Приготування екстракту з <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill.....	91
5.1.3. Підтвердження наявності сквалену та інших речовин.....	92
5.1.4. Результати ГХ-МС досліджень плодкових тіл <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill.....	93
5.2. Дослідження <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.....	96
5.2.1. Збір сировини <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.....	97
5.2.2. Приготування екстракту з <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.....	97

5.2.3. Результати досліджень плодових тіл <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.....	98
5.3. Дослідження <i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) В.К. Cui.....	105
5.3.1. Збір сировини <i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) В.К. Cui.....	105
5.3.2. Приготування екстракту з <i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) В.К. Cui.....	106
5.3.3. Результати досліджень плодових тіл <i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) В.К. Cui.....	106
Висновки до розділу 5.....	111
РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ КІЛЬКІСНИХ ТА ЯКІСНИХ ЗМІН ХІТИНУ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ДОЗРІВАННЯ ПЛОДОВИХ ТІЛ ГРИБІВ.....	
6.1. Мета дослідження.....	113
6.2. Збір сировини.....	114
6.3. Вибір розчинника для розчинення хітину креветок.....	114
6.4. Розчинення хітину креветок.....	115
6.5. Екстракція та первинне очищення хітину з грибної сировини.....	115
6.6. Визначення молекулярної маси.....	116
6.7. Інфрачервона спектрометрія.....	118
Висновки до розділу 6.....	120
РОЗДІЛ 7. ПОШУК МЕТОДІВ ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ СКВАЛЕНУ В ЕКСТРАКТАХ ГРИБІВ.....	
7.1. Мета дослідження.....	122
7.2. Тербінафіну гідрохлорид, як засіб для збільшення кількості сквалену в плодових тілах грибів.....	122
7.3. Сквален одержаний з плодів щириці, як зразок для порівняння.....	124
7.4. Опис експерименту по збільшенню вмісту сквалену в грибах.....	124
7.5. Результати досліджень.....	126
Висновки до розділу 7.....	133
ВИСНОВКИ.....	134

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	136
ДОДАТКИ.....	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АНД – аналітично нормативна документація;
- БАР – біологічно-активні речовини;
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
- ВМС – високомолекулярні сполуки;
- ГХ-МС – газова хроматографія-мас-спектрометрія;
- ІЧ-спектроскопія – інфрачервона спектроскопія;
- ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності;
- Рис. – рисунок;
- ТШХ – тонкошарова хроматографія;
- Табл. – таблиця;
- УФ-світло – ультрафіолетове світло;
- FTIR spectroscopy – Fourier-transform infrared spectroscopy (інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є);
- TLC – thin layer chromatography (тонкошарова хроматографія);
- HPLC – high-performance liquid chromatography (високоефективна рідинна хроматографія);
- HPLC-MS – high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (високоефективна рідинна хроматографія-мас-спектрометрія);
- GC-MS – gas chromatography–mass spectrometry (газова хроматографія-мас-спектрометрія).

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Сквален — це ациклічний тритерпен, присутній в організмі людини в якості проміжної ланки в біосинтезі холестерину і інших сполук. Проявляє антиоксидантні, протизапальні, антиканцерогенні, кардіозахисні та ряд інших властивостей. Використовується в медицині для регуляції ліпідного обміну і в дерматології [1]. Сквален також використовувався як ад'ювант у вакцинах, що стимулює імунну відповідь і збільшує реакцію пацієнта на вакцину. Його додають до ліпідних емульсій при виготовленні вакцин [2]. Одержання сквалену стало особливо актуальним у часи пандемії Covid-19.

Основним сировинним джерелом для одержання сквалену на сьогоднішній день є жир з печінки морських тварин. Найбагатшим джерелом одержання сквалену є жир з печінки глибоководних акул, де його вміст може сягати 60 – 90 % [1]. Проте наявність в печінках морських тварин холестерину ускладнює очистку сквалену. Як альтернативне джерело для одержання сквалену є жирні олії з насіння рослин. Однією з найбагатших на сквален олією вважається олія з насіння амаранту, де вміст сквалену може сягати 5 – 8 %. В інших рослинних оліях вміст нижчий, і рідко перевищує 1 %.

Сквален отриманий з рослинної сировини зазвичай має менший рівень чистоти ніж тваринний, що не є проблемою для дерматології і косметології, де він використовується зазвичай зовнішньо. Можливість заміни сквалену тваринного походження на сквален рослинного походження в препаратах для внутрішнього застосування, особливо в якості ад'юванта для вакцин, підтверджується рядом досліджень. [1]

Складність отримання сквалену з морських тварин, збільшення попиту на цю сполуку в медицині і косметології а також необхідність захисту морської флори і фауни піднімають питання пошуку нових джерел отримання сквалену,

в першу чергу серед наземних рослин, які можна культивувати в необхідній кількості.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом комплексної науково-дослідної роботи ДНТ "Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького" (державна реєстрація № 0121U107504)

Мета та завдання дослідження. Здійснити пошук джерел сквалену в природній сировині і розробити комплексну методику одержання сквалену і інших біологічно активних речовин з цієї сировини.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

На основі проведеного пошуку вибрати найбільш перспективні сировинні джерела сквалену для культивування;

Дослідити динаміку нагромадження сквалену в природній сировині;

Розробити методику очистки сквалену з сировини найбільш перспективних джерел;

Розробити комплексну методику одержання цінних біологічно активних речовин з сировини при одержанні сквалену в одному технологічному циклі.

Розробити методи для збільшення вмісту сквалену в сировині.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблена комплексна методика отримання ліпофільних, водних і спиртових екстрактів, з одного зразка сировини плодів щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) в один технологічний цикл. Розроблена методика отримання біологічно-активних речовин з надземної частини щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.), яка залишається після одержання насіння.

Проаналізовано 20 видів грибів класу *Agaricomycetes* і один вид класу *Pezizomycetes* на вміст сквалену і інших біологічно-активних речовин, як

потенційних сировинних джерел сквалену. Встановлено, що на ранніх стадіях зрілості вміст сквалену найбільший.

Проведені детальні дослідження видів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. і *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй, як одних з найбільш перспективних джерел сквалену з грибів класу *Agaricomycetes*. Встановлено, що культивовані форми містять суттєво менше сквалену, ніж дикорослі форми, що піднімає питання по вивченню оптимальних умов проростання плодових тіл для збільшення виходу сквалену з сировини.

Проведені дослідження на вміст хітину в шроті з плодових тіл грибів, який залишається після попередніх екстракцій в рамках комплексного використання сировини. Розроблені методики виділення і очищення хітину з плодових тіл видів: *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Lycoperdon perlatum* Pers. та *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй. Проведено визначення молекулярної маси і ІЧ-спектроскопію отриманого хітину.

Проведені дослідження по збільшенню вмісту сквалену в плодових тілах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. внаслідок інгібування скваленоксидази тербінафіном гідрохлоридом. Встановлено, що таким способом можна отримати в рази більший вихід сквалену на 100 г. сухої сировини ніж з найбільш поширеного рослинного джерела сквалену роду щириці (*Amaranthus*).

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена методика одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів (патент України на корисну модель. № 126361, опубл. 11.06.2018, Додаток В). Розроблений спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щириці хвостатої (патент України на корисну модель №148769, опубл. 15.09.2021, Додаток Г). Розроблений спосіб підвищення кількості сквалену у ліпофільних екстрактах плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.

Kumm.) (патент України на корисну модель прийнятий до розгляду 10.02.2026, номер заявки: u202600666)

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання роботи автором реалізовано виконання експериментальної частини, узагальнення результатів та формулювання положень і висновків, які виносяться на захист. Співавторами наукових праць є науковий керівник, а також науковці, з якими проводились спільні фізико-хімічні дослідження.

Апробація результатів дослідження. Основні положення дисертаційної роботи було представлено на науково-практичних конференціях:

Phytochemical Society of Europe Meeting 2022 (Jasi, Romania, 19-22 September 2022);

V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" (р. (Харків, 14 квітня 2023 р.);

VII Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження". (Харків, 11 квітня 2025 р.);

X Міжнародна науково-практична конференція "Science of post-industrial society: globalization and transformation processes" (Вінниця 06 березня 2026);

звітні конференції аспірантів фармацевтичного факультету ЛНМУ (Львів, 2023, 2024, 2025).

Робота заслухана та обговорена на засіданні кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ДНТ "ЛНМУ імені Данила Галицького" (Львів, 2026).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 12 наукових робіт, з них: 5 статей в наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Scopus і Web of Science, 5 тез доповідей на науково-практичних конференціях і 2 патенти на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 170 сторінках друкованого тексту, з яких 113 основного тексту. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, п'ятих розділів власних досліджень, висновків, списку використаної літератури та додатків. Робота ілюстрована 32 таблицями та 31 рисунками. Список використаних джерел містить 155 найменувань.

РОЗДІЛ 1

СКВАЛЕН: ВЛАСТИВОСТІ, ОТРИМАННЯ, ВИКОРИСТАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Сквален вперше виділив в 1916 році японський лікар Мітцумаро Цудхімото, який добув цю сполуку з печінки глибоководної акули. [3] Від латинської назви акули (*squalus*) і походить його назва.

1.1. Фізико-хімічні властивості сквалену

Хімічна назва сквалену 2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаєн, загальної формули $C_{30}H_{50}$. Являє собою ациклічний тритерпен, який містить 6 подвійних зв'язків (Рис. 1.1.).

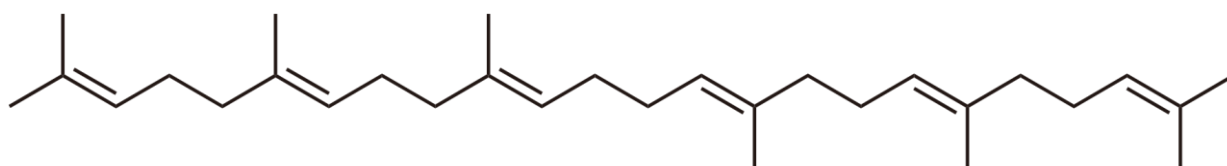


Рис. 1.1. Структурна формула сквалену

У чистому вигляді сквален це безбарвна олія без запаху та смаку. Молекулярна маса 410,7 г/моль, густина 0,8584 г/см³, температура плавлення - 75 °С, температура кипіння при нормальному атмосферному тиску (760 мм. рт. ст.) теоретично становить близько 420 °С, але на практиці сквален починає розкладатися вже при 300-350 °С, при тиску в 25 мм. рт. ст. сквален кипить при 285 °С, показник заломлення 1,499 Легко розчинний в петролейному і діетиловому ефірах, ацетоні. Погано розчинний в спиртах. У воді не розчиняється. Сквален — нестабільна сполука, яка швидко окислюється при контакті з повітрям. Зовнішньо це проявляється пожовтінням субстанції. Для

забезпечення тривалого зберігання сквалену його гідратують до більш стійкої сполуки — сквалану (Рис. 1.2.).

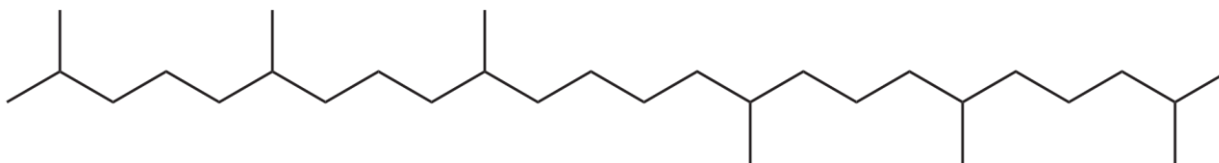


Рис. 1.2. Структурна формула сквалану

1.2. Природні джерела сквалену

1.2.1. В організмах тварин

Найбагатшим джерелом сквалену є жир з печінки глибоководних акул, які живуть в океані на глибині від 300 до 1500 м. Вміст сквалену в печінці може сягати 60-90% [1]. Причина такого великого вмісту сквалену полягає в необхідності забезпечувати необхідний рівень плавучості в товщі води. Більшість кістяних риб використовують плавальний міхур для забезпечення власної плавучості. Акули будучи хордовими рибами не мають плавального міхура і в основному підтримують свою плавучість завдяки постійному руху, під час якого довгі і широкі грудні плавники створюють достатньо підйомної сили. Для глибоководних акул цього ефекту недостатньо, що частково компенсується печінкою великого розміру повної жирових відкладень. Жири роблять печінку менш щільною ніж вода, що дозволяє підтримувати плавучість. У глибоководних акул печінка може становити до 20% від маси тіла. [4] І однією з основних сполук, що забезпечують необхідну кількість жирових відкладень в печінці є саме сквален. В деяких видів глибоководних акул сквален може становити до 15% від маси тіла [5].

Щорічно для добування сквалену виловлюють від трьох до шести мільйонів глибоководних акул. Жир вилучають методом витоплювання або центрифугування, а сквален очищують методом дистиляції. Для запобігання окислення сквалену під час очищення та зберігання використовують інертні

гази, наприклад, азот і низькі температури. Інший спосіб це піддати сквален гідрогенізації, для отримання більш стійкої форми — сквалану. Який може бути використаний для засобів зовнішнього застосування в дерматології і косметології.

В період пандемії Covid-19 зріс попит на сквален у зв'язку з активними розробками і впровадженнями протиковідних вакцин зі скваленовмісним ад'ювантом. Це викликало стурбованість у природоохоронних організацій, так як приводило до збільшення вилову глибоководних акул, кількість яких і так суттєво зменшилася в останні роки. Екологічні та ряд інших проблем по вилову акул збільшили зацікавленість по отриманню сквалену з інших джерел [6-8].

1.2.2. Рослинна сировина

Жирні олії з насіння рослин є альтернативним джерелом сквалену. Однією з найбагатших скваленом є олія з насіння щириці, де вміст сквалену може сягати до 5-8% [9]. В амарантовій олії яку добувають зі щириці вміст сквалену може становити до 9,87 г. на 100 г. [10]. В оливковій олії міститься від 484 до 826 мг сквалену на 100 г. олії. [11,12]. В інших рослинних оліях вміст нижчий і рідко перевищує 0,3% [6] (Табл. 1.1.).

Таблиця 1.1.

Порівняльний вміст сквалену в різних нерафінованих рослинних оліях

Рослинна олія	Вміст сквалену в мг/100 г.
Амарантова олія	5942 – 8000
Оливкова олія	484 – 826
Олія рисових висівок	15 – 330
Арахісова олія	~ 27
Кукурудзяна олія	~ 27
Олія зародків пшениці	~ 27
Соєва олія	10 – 17

Сквален отриманий з рослинної сировини зазвичай має менший рівень чистоти ніж тваринний, що не є проблемою для дерматології і косметології, де він використовується зазвичай зовнішньо. Можливість заміни сквалену тваринного походження на сквален рослинного походження в препаратах для внутрішнього застосування, особливо в якості ад'юванта для вакцин, підтверджується рядом досліджень [6].

В наших дослідженнях нам потрібен був зразок для порівняння і оскільки в амарантовій олії вміст сквалену найбільший, ми зосередилися на одному з видів щириці. А саме на щириці хвостатій (*Amaranthus caudatus* L.), так як даний вид культивується як декоративна рослина у Львівській області. (Рис. 1.3.)



Рис. 1.3. Квітуча рослина щириця хвостата (*Amaranthus caudatus* L.)

Насіння щириці, зокрема *Amaranthus caudatus* L., нещодавно розглядалося як продовольча культура, подібна до кукурудзи, квасолі та картоплі. Вже сьогодні його вирощують у великих кількостях у деяких країнах. Цей інтерес зумовлений його відносно високим вмістом білка (14–18%), збалансованим амінокислотним складом та здатністю рости в різних кліматичних зонах [13,14]. Овочі та зернові видів *Amaranthus* були одними з

улюблених продуктів харчування в "доколумбовій" Америці, а в останні десятиліття і в Африці, головним чином завдяки їхнім безглютеновим білкам та високоякісному складу незамінних амінокислот [15].

В Україні проводилися фармакогностичні дослідження щириці на базі Національного фармацевтичного університету в Харкові [16], вивчалось застосування олії щириці в кардіологічній практиці [17] і за умов хронічної інтоксикації [18], а також як добавка для лікування тварин [19]. В інших дослідженнях було доведено, що використання 5–15% борошна із насіння щириці української селекції покращує якість та харчову цінність хліба [20].

Види щириці також використовувалися в народній медицині. Наприклад, *Amaranthus viridis* використовується в Індії та Непалі для зменшення переймів та для лікування болю та лихоманки.

Експерименти підтвердили також виражений жарознижувальний ефект метанольного екстракту з цієї рослини [21].

Насіння щириці характеризується високим вмістом тритерпеноїдів, які є потенційними антинутриєнтами [22,23], але можуть бути цікавими для медицини. Крім того, насіння містить N-ацетил-D-галактозамін-специфічний лектин, який знайшов застосування в біохімічних та гістохімічних дослідженнях [24,25].

1.2.3. Мікроорганізми

Одним із альтернативних напрямків отримання сквалену, який зараз активно розвивається, являється біотехнологічний напрямок мікробної ферментації, який здійснюється шляхом культивування в біореакторах із забезпеченням необхідних умов для активного росту мікроорганізмів.

Мікрородорості можуть виробляти сквален внаслідок підбору оптимального поживного середовища і створення необхідних умов культивування. [26-28].

Aurantiochytrium (до 1,29 г/л)

Thraustochytrium (до 1,49 г/л)

Schizochytrium (до 1,13 г/л).

Звичайні дріжджі можуть виробляти лише 0,01 – 0,1 г/л. Тоді як генетично модифіковані штами дріжджових грибів здатні виробляти сквален в значних кількостях через підсилення "мевалонатного шляху" біосинтезу внаслідок генетичних змін [29].

Yarrowia lipolytica (до 12 г/л).

Saccharomyces cerevisiae (до 25 г/л)

Генномодифікована *Escherichia coli* з геном скваленсинтази, або повним впровадженням "мевалонатного шляху" біосинтезу шляхом генної модифікації здатна виробляти сквален в кількостях, від 11 до 15 г/л.

1.2.4. Гриби, як джерело сквалену

Як потенційним джерелом сквалену можуть виступати ксилотрофні гриби, які є представниками справжніх грибів відділу *Basidiomycota*. Для переважної більшості представників цієї групи субстратом є деревина або живі тканини дерев і чагарників. Порівняно з шапковими грибами, плодові тіла багатьох видів ксилотрофних грибів можуть існувати досить тривалий період часу, а їх формування менше залежить від зовнішньої вологи. Це дереворуйнівні гриби, які відіграють основну роль у руйнуванні лісової підстилки та, як наслідок цього процесу, у кругообігу речовин у природі. Вони очищають ґрунт від численних опалих листків, хвої, гілочок, знищують пні дерев, мертві, зламані та повалені вітром стовбури, колоди, залишені в лісі на місці вирубки. Більшість з них не становлять харчового інтересу, але можуть бути цікавими як джерело інших біологічно активних речовин. В останні десятиліття вони активно вивчаються з точки зору застосування в медицині, оскільки синтезують широкий спектр різних біологічно активних сполук, таких як полісахариди [30], ферменти [31], органічні кислоти, тритерпенові та стероїдні речовини [32], антибіотики [33].

Виявлення сквалену в деяких представниках цієї групи грибів у кількостях, більших, ніж у більшості рослинних олій, відкриває перспективи використання цієї сировини для її виробництва. Це дозволяє зберегти цінну амарантову олію та використовувати ксилотрофні гриби, які можна культивувати на сухості або на залишках деревообробної промисловості. Сьогодні добре розроблена технологія культивування низки грибів, що мають харчове або лікувальне застосування, зокрема, гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) [34], аурікулярії (*Auricularia auricula-judae*) [35], шіїтаке (*Lentinula edodes*) [36].

1.2.4.1. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Basidiomycota, Agaricomycetes, Agaricales)

Одним з основних видів на якому ми зосереджували увагу в наших дослідженнях — це глива звичайна (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.). В основному тому що, даний гриб вже активно культивується в Україні і має широкий спектр властивостей актуальних для комерційного використання. (Рис. 1.4.)



Рис. 1.4. Плодові тіла гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.)

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm. – це гриб, який дико росте на мертвій деревині та ослаблених деревах, переважно листяних. Цей гриб їстівний, його вживають у вареному, смаженому та сушеному вигляді. Вирощують у промислових масштабах. Він невибагливий до кліматичних умов і має життєздатний міцелій, який може витримувати тривале зберігання [37]. Гриб здатний рости на різноманітних сільськогосподарських субстратах: кукурудзяних качанах, бамбукових відходах [38], чайних відходах, тирсі липи і вільхи, грабовій стружці, соломі пшениці, лушпиннях насіння соняшника [39], а також на різноманітних целюлозно-паперових відходах [40]. Сьогодні виведено велику кількість сортів грибів, які відрізняються морфологічними характеристиками та хімічним складом їхніх плодових тіл [41].

Згідно з літературними даними, плодові тіла гриба містять до 8% мінеральних елементів, основну частку яких складають калій, магній, натрій та фосфор, хоча їх рівень залежить від вмісту в субстраті, на якому вирощуються ці гриби [39,42], та включають весь комплекс вітамінів групи В та жиророзчинні вітаміни D2 та Е [43]. Вважається, що полісахариди, зокрема β -глюкани міцелію та плодових тіл гриба, мають лікувальні властивості. Полісахаридна фракція плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. виявила противірусну активність проти вірусу грипу А. Плеуран (нерозчинний β -1,3/1,6-D-глюкан *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) значно скоротив тривалість симптомів простого герпесу у пацієнтів [44]. Крем на основі плеурану зменшував еритему, викликану УФ-випромінюванням, на шкірі людини, а тривале використання цього крему протягом 30 днів покращувало всі контрольовані параметри шкіри обличчя та тіла [45]. Полісахаридний комплекс плодових тіл гриба також містить хітин, з якого можна отримати хітозан з меншою молекулярною масою, ніж хітозан з креветок та крабів [46].

Біологічно активні речовини, отримані з *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., мають радіозахисну, імуностимулюючу, антиоксидантну, протипухлинну та антисклеротичну дію [47]. Було виявлено, що *Pleurotus*

ostreatus (Jacq.) P. Kumm. є добрим сорбентом важких металів, радіонуклідів та токсинів [48].

Мицелій та плодові тіла *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. містять ферменти, що становлять промисловий інтерес. Ксиланазу, лаккази та целюлази було виявлено у водних екстрактах [49,50]. Ферментний комплекс, отриманий з відпрацьованого субстрату *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., було додано до корму кіз для вивчення його впливу на склад та вихід козячого молока. Було зроблено висновок, що додавання ферментативного екстракту відпрацьованого субстрату *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. до раціону кіз збільшує вихід свіжого сиру, а також впливає на його колір та текстуру [49]. Необроблені лаккази з *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. можна використовувати для очищення стічних вод від органічних мікробруднювачів, таких як ліки [51].

1.2.4.2. *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murril (*Aphyllorphorales*, *Polyporaceae*)

Ще один актуальний для наших досліджень гриб — це *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, так як він широко поширений в Україні і здатен рости в аналогічних умовах, що і *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., що спрощує процес розроблення методик для його культивування. (Рис. 1.5.)



Рис. 1.5. Сірчано-жовтий трутовик *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill – базидіоміцетний гриб, поширений у Європі, Азії, Африці та Америці, який спричиняє руйнування стовбурів дерев [52,53]. *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill характеризується інтенсивним жовтим або помаранчевим кольором, м'ясистими базидіокарпами та трубчастими гіменофорами [54]. Це їстівний гриб з гарною харчовою цінністю. Крім того, цей гриб здавна використовується у фітотерапії [55,56]. Доведено, що він має протипухлинні, антимікробні та противірусні властивості [57]. Він широко поширений в Україні, його плодові тіла можна побачити в середині травня або на початку осені на листяних деревах, іноді протягом багатьох років. Це досить швидкозростаючий гриб, який може досягати значних розмірів; іноді з одного стовбура дерева можна зібрати кілька десятків кілограмів.

Жовтий або помаранчевий колір плодових тіл зумовлений наявністю полієнових кислот неізопреноїдної природи, які називаються летипоровими кислотами А, В та С [58,59]. Серед речовин, розчинних у неполярних розчинниках, були виявлені стероїди, зокрема ергост-7,22-дієн-3 β -ол, ергостерол, ергост-7-ен-3 β -ол та інші [60].

1.3. Хімічний синтез сквалену (недоліки і переваги над одержанням із природніх джерел)

З моменту відкриття сквалену було розроблено декілька методів синтезу сквалену в лабораторних умовах, оснований на різних реакціях.

Реакція Вюрца. Вперше синтез здійснений в 1931 році. За цим методом відбувається відновне сполучення двох молекул фарнезилброміду з використанням металевого натрію в ефірному розчиннику [61].

Реакція Мак-Муррі. Цей метод забезпечує відновну димеризацію двох молекул фарнезалю під дією солей титану низької валентності [62].

Реакція Кляйзена. Реакція відбувається при нагріванні алільного спирту з ортоестером у присутності слабого кислотного каталізатора з утворенням

проміжного кетенацеталу, який потім перегрупується в ненасичений естер [63,64].

Реакція Віттіга-Горнера. За цією реакцією відбувається конденсація гераніацетону з фосфонатним естером, отриманим з дихлорбутану [65].

На сьогоднішній день синтетичний сквален в лабораторних умовах переважно отримують з гераніацетону, за допомогою реакції Віттіга-Горнера [66].

Проте, хоч синтез сквалену можливий, і вже використовується, але він досить складний у виконанні для широкого застосування в промисловості, а з економічної точки зору вартість синтетичного сквалену вища ніж вартість сквалену добутого з природних джерел. Ускладнює це завдання також нестабільність сквалену, який легко окислюється, тому частіше синтезують його більш стабільну гідрогенізовану форму — сквалан.

1.4. Біосинтез сквалену і його подальші перетворення.

В основі біосинтезу сквалену лежить "мевалонатний шлях", який призводить до утворення фарнезилдифосфату. Синтез сквалену відбувається через сполучення двох молекул фарнезилдифосфату під дією скваленсинтетези в ендоплазматичному ретикулумі (Рис. 1.6.).

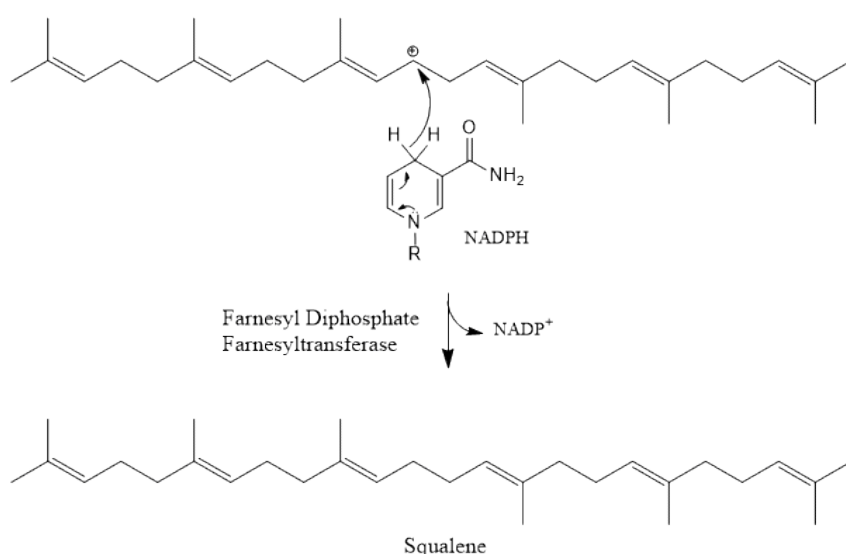


Рис. 1.6. Синтез сквалену на етапі мевалонатного шляху біосинтезу

Сквален є біохімічним попередником в біосинтезі стеролів, в тому числі холестерину і стероїдних гормонів в організмі людини [67-69].

В процесі біосинтезу сквален окислюється під дією скваленоксидази (скваленмонооксигенази) до 2,3-оксидосквалену, який являється важливим каталізатором в біосинтезі стеролів (Рис. 1.7.).

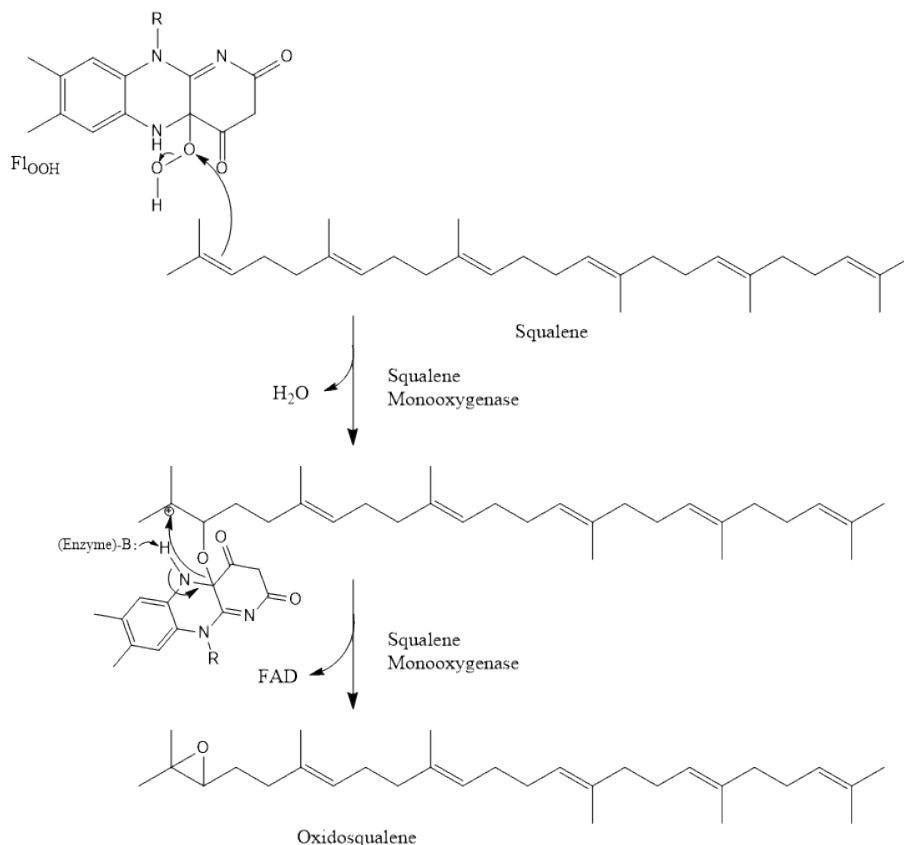


Рис. 1.7. Перетворення в оксидосквален

Внаслідок подальших ферментативних перетворень з 2,3-оксидосквалену під дією оксидоскваленциклази утворюється ланостерол (Рис. 1.8.).

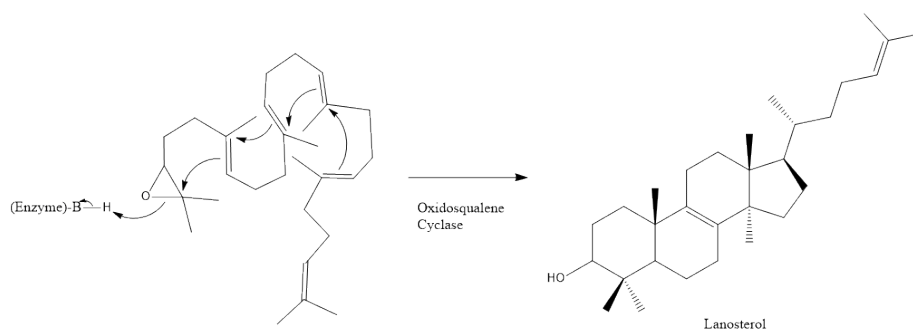


Рис. 1.8. Циклізація оксидосквалену з утворенням ланостеролу

Ланостерол в свою чергу є вихідною сполукою для біосинтезу холестерину і стероїдних гормонів в тварин, стигмастеролу в рослин і ергостеролу в грибах [68].

1.5. Речовини, що впливають на вміст сквалену.

Збільшення кількості сквалену може відбуватися через стимулювання "мевалонатного шляху" в цілому, наприклад, інсулін здатен стимулювати ГМГ-КоА-редуктазу, що збільшує біосинтез всіх сполук пов'язаних з "мевалонатним шляхом", в тому числі сквалену, який починає накопичуватися як не використана проміжна сполука.

Більш "точний" спосіб пов'язаний з інгібуванням скваленоксидази (скваленмонооксигенази). Такі протигрибкові речовини як тербінафін, бутенафін, нафтефін, толнафат, толциклат через пригнічення скваленоксидази, блокують перетворення сквалену в оксидосквален, що призводить до накопичення сквалену.

Зменшують біосинтез сквалену статини, такі як аторвастатин, розувастатин. Вони блокують ГМГ-КоА-редуктазу, внаслідок чого біосинтез всіх сполук пов'язаних з " мевалонатним шляхом" суттєво гальмується.

Знову ж таки більш "точний" підхід у інгібіторів скваленсинтетази, таких як сарагозинові кислоти [70,71] або NB-598 [72], які блокують безпосередньо перетворення фарнезилпірофосфату на сквален, не зачіпаючи побічні гілки, як наприклад синтез коензиму Q 10.

Високий рівень холестерину, жовчних кислот, а також самого сквалену (наприклад, отриманий ззовні в значних дозах) пригнічують активність ГМГ-КоА-редуктази за принципом негативного зворотнього зв'язку [73-77].

1.6. Використання сквалену в медицині

Сквален використовувався як препарат, у дерматології та як ад'ювант у вакцинах [1].

З літератури відомо, що найвищий вміст сквалену в тканинах людини міститься в ліпідах шкіри (близько 500 мкг/г) та жировій тканині (\approx 300 мкг/г) [78]. До 12% сквалену міститься в шкірному салі [79]. Секреція сквалену становить від 125 до 475 мг на добу [80].

Пом'якшувальні та зволожувальні властивості сквалену та його біосумісність зі шкірою людини призвели до його введення до складу низки дерматологічних і косметологічних продуктів, де застосовується його більш стабільна форма — сквалан. Сквалан проявляє себе як ефективний ранозагоювальний засіб, а також захищає шкіру від пошкодження вільними радикалами та запобігає її старінню, яке відбувається внаслідок перекисного окислення ліпідів під впливом УФ-випромінювання [81,82].

Сквален являється потужним імуностимулятором, що призвело до його активного використання як одного з основних компонентів для ад'ювантів у вакцинах, що стимулює імунну відповідь та посилює реакцію пацієнта на вакцину. Використання ад'ювантів у вакцинах дозволяє знизити вміст антигену необхідного для появи імунної відповіді. Це особливо актуально для дітей, людей похилого віку і пацієнтів з імунодефіцитом різного генезу, для яких стандартні дози антигену у вакцинах можуть становити небезпеку. Найбільш поширені скваленовмісні ад'юванти це — MF59 (Novartis) і AS03 (GlaxoSmithKline). Ад'ювант вакцини MF59 у формі емульсії "олія у воді" на основі сквалену був введений понад 100 мільйонам людей у понад 30 країнах для пацієнтів з грипом, гепатитом В, малярією та оперізувальним лишаєм [2,83,84].

У низці робіт досліджувався механізм впливу ад'ювантів на основі сквалену на імунні клітини та стратегія створення вакцин з використанням

ад'ювантів [83-86]. Зокрема, було показано, що використання сквалену в наночастинках має значні переваги порівняно з іншими ад'ювантами [87].

Покращена ефективність цисплатину в лікуванні раку товстої кишки також досягається завдяки створенню перорально введених наночастинок зі скваленом, завантажених цисплатином [88].

Прийом сквалену знижує рівень загального холестерину та ЛПНЩ порівняно з плацебо. Виявлено, що низькі дози (близько 500 мг) можуть бути ефективнішими для зниження ліпідів за принципом негативного зворотного зв'язку, тоді як надвисокі дози (понад 1 г) іноді призводили до короткочасного підвищення рівня холестерину через його активне включення в синтез [1].

Випробування на тваринах показали захисний ефект сквалену проти ішемічної хвороби серця завдяки його впливу на пригнічення перекисного окислення ліпідів, спричиненого ізопреналіном [89].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Загальна методологія досліджень

Зібрану сировину висушували в сушильній шафі за температури 55–65 °С. Або заморожували в морозильній камері для збереження, а перед використанням — розморожували при кімнатній температурі і висушували в сушильній шафі за температури 55–65 °С. Висушену сировину зважували, подрібнювали, перемелювали в електричному млинку, просіювали через сито, повторно зважували і екстрагували відповідним розчинником. В якості розчинників переважно використовувалися: петролейний ефір, гексан, хлороформ, метанол, етанол, дистильована вода, ізотонічний розчин NaCl. Екстракція проводилася одним з двох методів: (1) холодна екстракція (якщо нагрівати екстракт було небажано) — в хімічному стакані з використанням електричної мішалки, (2) гаряча екстракція — в апараті Сокслета при нагріванні. По завершенні отриманий екстракт центрифугували, при необхідності фільтрували. Шрот висушували в сушильній шафі за температури 55–65 °С, зважували і піддавали повторній екстракції іншим розчинником. Данну процедуру повторювали декілька разів з різними розчинниками до повного видалення біологічно-активних речовин з сировини доступними нам методами. Розчинник з отриманих рідких екстрактів відганяли методом дистиляції для повторного використання. Сконцентрований рідкий екстракт, після відгонки розчинника випарювали в сушильній шафі до сухого залишку за температури 55–65 °С, зважували і аналізували на вміст біологічно-активних речовин. Якщо екстракт містив велику кількість різних речовин, його розділяли на фракції за допомогою колонкової (іонообмінної, гель або афінної) хроматографії вручну або в рідинному хроматографі. Аналіз біологічно-активних речовин проводили методами: тонкошарової хроматографії на силуфолових пластинах з відповідними речовинами-свідками, газової

хроматографії-мас-спектрометрії, високоефективної рідинної хроматографії-мас-спектрометрії, інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є, ультрафіолетової спектроскопії, рефрактометрії, віскозиметрії, йодометрії, гравіметрії і за якісними реакціями.

2.2. Сировина

У роботі використовували насіння та надземну частину щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.), що вирощували на присадибній ділянці у Львові протягом 2020 – 2025 рр.

Сировину (плодові тіла грибів) збирали самостійно в літньо-осінній період з дикорослих або культивованих форм у Львівській області, переважно в Стрийському районі (Сколівські Бескиди). Також використовувалася культивована форма *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromycel PL132 яка була взята з ТОВ "Добрий Гриб" (Львівська область, село Лавриків).

В процесі досліджень ми використовували наступну сировину:

надземну частину (стебла, листя, плоди) Щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.);

плодові тіла гриба класу *Pezizomycetes* виду *Sarcoscypha coccinea* (Jacq.) Lambotte;

плодові тіла грибів класу *Agaricomycetes*, 20 видів:

Boletus subtomentosus L.,

Cantharellus cibarius Fr.,

Coriolus versicolor (L.) Quéf.,

Craterellus cornucopioides (L.) Pers.,

Flammulina velutipes (Curtis) Singer,

Fomitopsis betulina (Bull.) B.K. Cui,

Hydnum repandum L.,

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill,

Lycoperdon perlatum Pers.,

Lycoperdon pyriforme Schaeff.,
Mucidula mucida (Schrad.) Pat.,
Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.,
Polyporus badius (Pers.) Schwein.,
Polyporus squamosus (Huds.) Fr.,
Postia stiptica (Pers.) Jülich,
Rycnoporus cinnabarinus (Jacq.) P. Karst.,
Russula virescens (Schaeff.) Fr.,
Scleroderma aurantium (L.) Pers.,
Suillus luteus (L.) Roussel,
Tyromyces chioneus (Fr.) P. Karst.;

плоди гіркокаштану звичайного (кінського каштану) (*Aesculus hippocastanum* L.);

хітин креветок Sigma Aldrich Co (Сент-Луїс, США) (партія № SLBL9061V).

2.3. Апаратура

Ваги електронні Axis-A500, ваги електронні Техноваги ТВЕ-0,21, газовий хроматограф-мас-спектрометр 6С/MS Agilent Technologies 6,890 N/5975 В, рідинний хроматограф-мас-спектрометр Agilent 1260 Infinity II, ІЧ-спектрофотометр Spectrum Two (PerkinElmer), ІЧ-спектрофотометр IR-Spirit-X (Shimadzu), спектрофотометр СФ-56, рефрактометр Mettler Toledo Easy R40, рН-метр-мілівольтметр, віскозиметр Ubbelohde VPŽ-4, сушильна шафа, електричний млинок, механічна мішалка, центрифуга, прилад для сублимаційної сушки, прилад для діалізу, прилад для електрофорезу, апарат Сокслета.

2.4. Розчинники, реактиви, буферні розчини

Розчинники: петролейний ефір, хлороформ, оцтова кислота, гексан, циклогексан, метанол, етанол, ізопропанол, бутанол, етилацетат, дистильована вода, 1%, 0,2 М, 1 М розчини хлориду натрію, 25% соляна кислота.

Реактиви: сульфат амонію, розчини FeCl_3 , AlCl_3 , ZrOCl_2 різних концентрацій, 10% водний розчин міді сульфату, розчин стибію (III) хлориду, розчини NH_4OH , NaOH , KOH різних концентрацій, розчин борної і лимонної кислот, розчин фенолу в сірчаній кислоті, 1,8% розчин соляної кислоти в етанолі, діазреактив, антроновий реактив, реактив Фелінга, металічний магній, концентровані соляна і сірчані кислоти, D-глюкоза, D-галактоза, D-маноза, L-рамноза, лактоза, рафіноза, 4-нітрофеніл- α -галактопіранозид, 4-нітрофеніл- β -галактопіранозид, 4-нітрофеніл- β -глюкозамінопіранозид, 4-нітрофеніл- β -глюкопіранозид, N-ацетил-D-галактопіранозид, N-ацетилнейрамінова кислота, D-глюкуронова кислота, ацетатні, 0,2% розчин нінгідрину в ацетатному буфері (рН 4.5), фосфатні і боратні буферні розчини з рН від 4,0 до 9,5.

2.5. Тонкошарова і колонкова рідинна хроматографія

Використовували пластини "Silufol" (Kavalier, Чеська Республіка) розміром 150 x 150 мм. Речовини наносили на пластину за допомогою тонкого капіляра. Використовували такі системи:

гексан або циклогексан,

гексан – хлороформ (1:1),

етилацетат – етанол – вода – аміак (65:25:9:1),

н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2),

н-бутанол – оцтова кислота – вода (5:1:2),

хлороформ – оцтова кислота – метанол – вода (60:32:12:8),

хлороформ – метанол – вода (65:50:10),

хлороформ – метанол – оцтова кислота (2:2:1),

етилацетат – оцтова кислота – вода (10:0,5:0,5),

бензол – етилацетат – оцтова кислота – формамід (70:30:2:1),
етилацетат – оцтова кислота – вода (10:2:3),
етилацетат – мурашина кислота – вода (90:6:9),
метиленхлорид – оцтова кислота (100:1),
петролейний ефір – ізопропанол (100:1),
гексан – ізопропанол (100:1),
циклогексанол – ізопропанол (100:1),
циклогексанол – ізопропанол (25:1),
гексан – ізопропанол – оцтова кислота (10:1:1),
декан – мурашина кислота (1:1),
декан – оцтова кислота (1:10),
декан – оцтова кислота (1:100),
ацетон – мурашина кислота (1:10),
ацетон – ізопропанол (1:10),
ацетон – етилацетат (1:10),
етанол – оцтова кислота (20:1),
етанол – циклогексанол (20:1).

Як свідки використовували розчини сквалену (чистота ≥ 98) (Sigma-Aldrich), рутину, есцину амінокислот (цистеїн, серин, метіонін, норлейцин, фенілаланін, пролін, валін, триптофан) та органічних кислот (стеаринової, олеїнової, пальмітинової).

Прояв хроматограм проводили в камері з парами йоду. Або за допомогою реактивів:

10% етанольний розчин стибію (III) хлориду,

1% етанольний розчин ваніліну,

0,5% розчин нінгідрину в 90% етанолі з додаванням 0.1 М цитратного буферного розчину (рН 6.0)

5% етанольний розчин ваніліну + 5% етанольний розчин сірчаної кислоти,

розчин анісового альдегіду в різних концентраціях,
20% етанольного розчину фосфорновольфрамової кислоти,
5% етанольного розчину молібден-фосфорної кислоти,
розчинів FeCl_3 і AlCl_3 в різних концентраціях,
суміші 0,025 мл анісового альдегіду, 0,5 мл оцтової кислоти, 4,25 мл метанолу та 0,25 мл концентрованої сірчаної кислоти.

Для утворення солей міді хроматограми поміщали в 7% водний розчин ацетату міді на 45 хвилин. Після цього пластину тричі промивали водою та поміщали на 10-15 хвилин у 5% водний розчин $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Для проявлення використовували також УФ-лампу.

Для колонкової рідинної хроматографії використовували колонки розміром 10 x 3,6 см (~100 мл), або меншого об'єму на $15 \pm 5,0$ мл. В якості наповнювача колонки використовували силікагель 40-160 мкм. (Chemapol), для звичайного розділення методом адсорбції і Toyopearl DEAE, для іонообмінної хроматографії. Елюат розливали в пробірки Еппендорфа. Для розділення великої кількості досліджуваного екстракту використовували прилад для флеш-хроматографії Pure C-810 фірми "Buchi"

2.6. Газова хроматографія-мас-спектрометрія

Використовували газовий мас-спектрометр 6С/MS Agilent Technologies 6,890 N/5975 В (США), підключений до хроматографічної колонки моделі HP-5MS, довжиною 30 м, діаметром 0,25 мм, з наповнювачем 95% диметилполісилоксану + 5% дифенілполісилоксану та гелієм як газом-носієм з постійною швидкістю 1,5 мл/хв. Колонку промивали метанолом. Газову хроматографію програмували на швидкість підвищення температури 15 °С/хв від 75 до 300 °С. Початкову температуру підтримували протягом 1 хвилини, а кінцеву – протягом 8 хвилин. Використовували мас-селективний детектор з температурою розділу фаз $T = 250$ °С. Іонізацію проводили електронним

ударом, енергія іонізації становила 70 eV, температура джерела іонів – 230 °C, а температура квадруполя – 150 °C.

Для ідентифікації компонентів у поєднанні з комп'ютерними програмами для ідентифікації AMDIS використовувалися бібліотеки мас-спектрів NIST05 та WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів понад 470 000. Відносна похибка визначення вищезазначених компонентів не перевищувала 10% з рівнем довіри 0,95.

2.7. Визначення молекулярної маси за допомогою віскозиметра

Молекулярну масу отриманих продуктів визначали за допомогою віскозиметра Ubbelohde VPŽ-4 з капіляром діаметром 0,82 мм, як описано для хітозану [90], за винятком того, що як розчинник використовували 25% HCl при температурі 4 °C.

2.8. Титрометричний метод визначення йодного числа

Опис методики

У конічну колбу з притертою пробкою зважують точну наважку досліджуваної речовини (0,1–0,5 г залежно від очікуваної ненасиченості). Додають 10–15 мл хлороформу в якості розчинника для повного розчинення речовини. Додають піпеткою рівно 25 мл реактиву Війса (розчин монохлориду йоду у льодяній оцтовій кислоті) або реактиву Гюбля (спиртовий розчин йоду та хлориду ртуті). Колбу закривають, перемішують і ставлять у темне місце на 30–60 хвилин (для повного приєднання галогену за подвійними зв'язками). Потім додають 15–20 мл розчину калію йодиду та 100 мл дистильованої води. Вільний йод титрують 0,1 М розчином натрію тіосульфату до солом'яно-жовтого кольору, додають свіжоприготовлений 1% розчин крохмалю (розчин синіє) і продовжують титрування до зникнення синього забарвлення.

Паралельно проводять контрольний дослід без досліджуваної речовини, але за тих самих умов.

Йодне число (X) обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(V_K - V_D) \times 0,01269 \times K \times 100}{m}$$

V_K – об'єм тіосульфату витрачений на контрольний дослід (мл),

V_D – об'єм тіосульфату витрачений на титрування досліджуваної речовини (мл),

0,01269 – кількість йоду, що відповідає 1 мл 0,1 М розчину тіосульфату;

K – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 М розчину тіосульфату (в нашому випадку $K=1$);

m – наважка досліджуваної речовини (г).

2.9. Визначення ензиматичної активності глікозидаз у плодових тілах грибів

Активність глікозидаз у екстрактах з плодових грибів визначали шляхом гідролізу субстрату (альфа або бета-феніл-D-глюко- та галактопіранозиду). Екстракт, що містив ензим (50 мкЛ) інкубували з 50 мкЛ 10 мМ розчину субстрату в 150 мкЛ буферу, рН 6,5 при +26 °С за 10 хв. Реакцію зупиняли додаванням 100 мМ карбонатного буферу, рН 10,2. Кількість звільненого нітрофенолу вимірювали при 405 нм. Одна одиниця активності – це кількість звільненого наномолів пара-нітрофенолу за 1 секунду [91].

2.10. Статистичний аналіз

Кожен експеримент проводили не менше, як у трьох повтореннях. Статистичну обробку виконували за допомогою пакету статистичних функцій "Microsoft Excel", з урахуванням середніх арифметичних величин та стандартної похибки середнього арифметичного. Дані були статистично

обраховані за допомогою t-критерію Стьюдента, а значення $p \leq 0,05$ вважалося статистично достовірними.

РОЗДІЛ 3

ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ЩИРИЦІ ХВОСТАТОЇ (*AMARANTHUS CAUDATUS L.*)

3.1. Мета дослідження

Щириця є цінною багатоцільовою культурою та джерелом низки дуже важливих біологічно активних речовин. Насіння щириці є одним з основних сировинних джерел сквалену для медичних і косметологічних засобів. Тож перед пошуком інших сировинних джерел ми вирішили добути сквален з насіння щириці доступними нам методами, для отримання зразка для порівняння, так як літературні джерела дають різну інформацію про вміст сквалену в насінні [92]. А також дослідити вміст інших біологічно-активних речовин як безпосередньо в насінні, так і в цілому в надземній частини рослини.

3.2. Розробка комплексної схеми отримання біологічно-активних речовин з насіння *Amaranthus caudatus L.* за один технологічний цикл.

На нашу думку, найціннішими речовинами в насінні щириці є сквален, який міститься в олії, та лектин, який знаходиться в ендоспермі. Для збільшення виходу лектину насіння, подрібнене на борошно, слід знежирити екстракцією органічними розчинниками. Якщо знежирення проводити гексаном або петролейним ефіром, то після відгонки розчинника можна отримати жирну олію, багату на сквален. Хоча в більшості випадків очищення лектину з насіння щириці проводиться після знежирення насіння, вплив органічних розчинників на знежирення в цих роботах не досліджувався [22,93,94].

Тритерпеноїди, які розчинні у воді та спиртах, можуть втрачатися під час екстракції лектинів з насіння щириці. Однак їх можна отримати в поєднанні з

екстракцією лектинів та виділенням жирної олії, але необхідно враховувати температурну лабільність лектину та його чутливість до осадження спиртом.

Метою дослідження було розробити оптимальну методику отримання сквалену, лектину і тритерпеноїдів, з максимальним можливим виходом даних речовин в один технологічний цикл, почерговими екстракціями різними розчинниками одного зразка сировини.

3.2.1. Виявлені складнощі в методах отримання сквалену і лектину в один технологічний цикл

Лектин є термолабільною речовиною та чутливим до органічних розчинників. Видалення жирної олії з насіння *Amaranthus caudatus* L. при добуванні лектину не є обов'язковим кроком, але без цього кроку вихід лектину може зменшитися. Однак вміст жирної олії в насінні *Amaranthus caudatus* L. низький ($42 \pm 5,0$ г на 1 кг подрібненого насіння), тому ми не помітили впливу на екстракцію лектину.

В зв'язку з термолабільністю лектину, після екстракції гексаном або петролейним ефіром за температури $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 1 години залишається лише 30 – 40 % початкової активності, а за $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ лектин повністю денатурується протягом 15 хвилин. Тому знежирення слід проводити за кімнатної температури. Це дещо знижує вихід олії із сировини, але отримується легший продукт, подібний за якістю до амарантової олії, яку отримують холодним пресуванням насіння для косметологічного та медичного використання.

3.2.2. Екстракція амарантової олії з насіння та очищення сквалену

Очищене насіння (1,0 кг) подрібнювали в електричному млинку, просіювали через сито з розміром отворів 0,5 мм. Додавали петролейний ефір (за температури кипіння $40\text{--}70\text{ }^{\circ}\text{C}$) у співвідношенні сировина–екстрагент 1:5 та ставили на електричну мішалку на 30 хвилин. Екстракцію проводили при

кімнатній температурі. Отриманий екстракт відтискали через марлю, центрифугували, і фільтрували. Відділені фільтруванням і центрифугуванням залишки шроту об'єднували з основною масою шроту. Екстракцією повторювали тричі. Розчинник відганяли з об'єднаних петролейних ефірних екстрактів, а залишок жирної олії сушили в сушильній шафі за температури 55–65 °С.

Виділення чистого сквалену з амарантової олії проводили рідинною хроматографією на силікагелі 40-160 мкм. (Chemapol, Чехія). Для цього 4,5 мл амарантової жирної олії наносили на колонку розміром 10 × 3,6 см (~100 мл). Після потрапляння олії в колонку її промивали циклогексаном. Фракції об'ємом 2,0 мл збирали у попередньо зважені пробірки Еппендорфа. Сквален виходить з першими фракціями елюату.

Наявність сквалену у фракціях визначали методом тонкошарової хроматографії на силуфолових пластинах. Як рухому фазу використовували монокомпонентну систему – циклогексан, в якості проявника використовували пари йоду, сквален проявлявся жовто-коричневою плямою при $R_f = 0,9$, також вимірювали показник заломлення ($D = 1,499$) та йодне число (382). Вихід амарантової олії з насіння склав 4,2%, маса сквалену становить ~4,8% від маси олії.

3.2.3. Виявлені складнощі в методах отримання лектину і тритерпенових сполук в один технологічний цикл

Лектин є лабільною сполукою, яка не витримує нагрівання вище 70 °С, осадження спиртом та ацетоном, а також значень рН нижче 4,0 та вище 11,0. Лектин із насіння щиряці, чутливий до спиртів, тому його не можна осадити з водних розчинів етанолом або метанолом, оскільки лектин незворотно денатурується. Щоб повністю запобігти втратам, слід екстракцію лектину водою проводити перед екстракцією тритерпеноїдів спиртами. Проте, як відомо з літератури [95], тритерпенові сапоніни, які мають ланцюг з більш ніж трьох

вуглеводних залишків, можуть добре розчинятися у воді. Тож для отримання максимального виходу тритерпеноїдів варто спочатку екстрагувати їх спиртами, що може привести к втратам лектину.

3.2.4. Вибір оптимального екстрагенту для тритерпенових сполук.

В якості оптимальних екстрагентів для отримання максимального виходу тритерпеноїдів при мінімальних втратах лектину, ми опробували ряд розчинників, в основному акцент робився на різні спирти в різних концентраціях. Екстракції проводили при кімнатній температурі, за співвідношення сировина-екстрагент 1:10, при постійному перемішуванні на механічній мішалці протягом 60 хвилин. Лектин виділяли і визначали активність. Відсоток зниження активності лектину розраховували по реакції преципітації з N-ацетил-D-галактозаміном. Результати цих дослідів представлені в Табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Вплив екстрагенту на вихід екстрактивних речовин та активність лектину

№	Розчинник та співвідношення сировини та екстрагенту	Вихід екстракту (у відсотках від сировини)	Відсоток зниження активності лектину
1	Дистильована вода (1:10)	16,8%	0%
2	1% розчин NaCl (1:10)	16,2%	0%
3	Метанол 50% (1:10)	2,9%	100%
4	Метанол 70% (1:10)	3,1%	100%
5	Метанол 100% (1:10)	3,2%	6%
6	Етанол 50% (1:10)	4%	100%
7	Етанол 70% (1:10)	3,5%	100%
8	Етанол 80% (1:10)	2,9%	25%
9	Етанол 96% (1:10)	2,1%	13%
10	Ізопропанол 50% (1:10)	8%	100%
11	Ізопропанол 100% (1:10)	1,9%	6%
12	Етилацетат (1:10)	1,2%	0%

В результаті ми встановили що, обробка порошкоподібного насіння спиртами, не розведеними водою, лише незначно знижує активність лектину на відміну від водних розчинів спиртів. Високі (але не низькі та середні) концентрації спиртів можуть бути використані для екстракції біологічно активних сполук з насіння щиріці без значної втрати лектинової активності.

3.2.5. Отримання есцину

Есцин з плодів гіркокаштану звичайного (кінського каштану) використовували як речовину-свідок при проведенні тонкошарової хроматографії. Отримували есцин за методикою описаною в патенті США [96].

Насіння гіркокаштану очищали від оболонки, подрібнювали і просіювали. 100 г подрібнених сирих насінин екстрагували в міксері з 500 мл 70% етанолу. Етанол відганяли до отримання сконцентрованого екстракту в кількості близько 70 мл. Ще більш сконцентрувати екстракт не вдалося, так як він починав активно пінитися. Так як сконцентрований екстракт виявився досить в'язким, для повного його видалення з колби витратили ще близько 70 мл етанолу. В результаті одержали близько 150 мл екстракту, трішки мутнуватого зеленуватого кольору. Його вибовтували з 300 мл етилацетату для видалення баластних речовин. Нижню фазу центрифугували і поставили на радіатор підсушуватись, а на ніч заклали в сушильну шафу за температури 55–65 °С.

Після висушування одержали 8,56 г світло-жовтого порошку екстракту гіркокаштану звичайного.

3.2.6. Визначення вмісту тритерпенових сполук.

Проводили дослід по визначенню пінного числа 1% розчинів водного екстракту знежиреного насіння щиріці, екстракту кори крушини і екстракту плодів гіркокаштану звичайного. Приблизне пінне число для екстракту плодів гіркокаштану — 10 000, для екстракту кори крушини — 2 000, для водного екстракту знежиреного насіння амаранту — 1 500. Так як в корі крушини

міститься незначна кількість сапонінів, їх наявність в водному екстракті шириці під питанням.

Провели якісні реакції на сапоніни:

– з 10% водним розчином міді сульфату і концентрованою сірчаною кислотою, при нагріванні на водяній бані протягом 20хв. Синьо-зеленого забарвлення не спостерігалось;

– з концентрованою сірчаною кислотою, з додаванням хлороформу. Забарвлення органічного прошарку в помаранчевий колір не спостерігалось;

– з гідратованим стибієм (III) хлоридом в хлороформі. Червоного забарвлення яке переходить в фіолетове не спостерігалось;

– з 1% етанольним розчином ваніліну з концентрованою сірчаною кислотою, при нагріванні на водяній бані протягом 20хв. Червоного або жовтого забарвлення не спостерігалось.

Всі якісні реакції на сапоніни для досліджуваних зразків дали негативний результат.

Наявність тритерпенових речовин в отриманих екстрактах визначали методом тонкошарової хроматографії на силуфолових пластинах. Використовували систему розчинників: хлороформ – оцтова кислота–метанол–вода (60:32:12:8). Обробку хроматограм проводили наступними реагентами:

(А) 20% етанольний розчин фосфорновольфрамової кислоти;

(В) суміш, що містить 0,025 мл анісового альдегіду, 0,5 мл оцтової кислоти, 4,25 мл метанолу та 0,25 мл концентрованої сірчаної кислоти;

(С) 5% етанольний розчин молібден-фосфорної кислоти.

Після обробки хроматограм реагентами, силікагелеві пластини нагрівали протягом 10 хвилин у сушильній шафі при 100 °С. Речовини стероїдної природи проявилися у вигляді коричневих (реагенти А та В) або синіх плям (реагент С). (Рис. 3.1.)

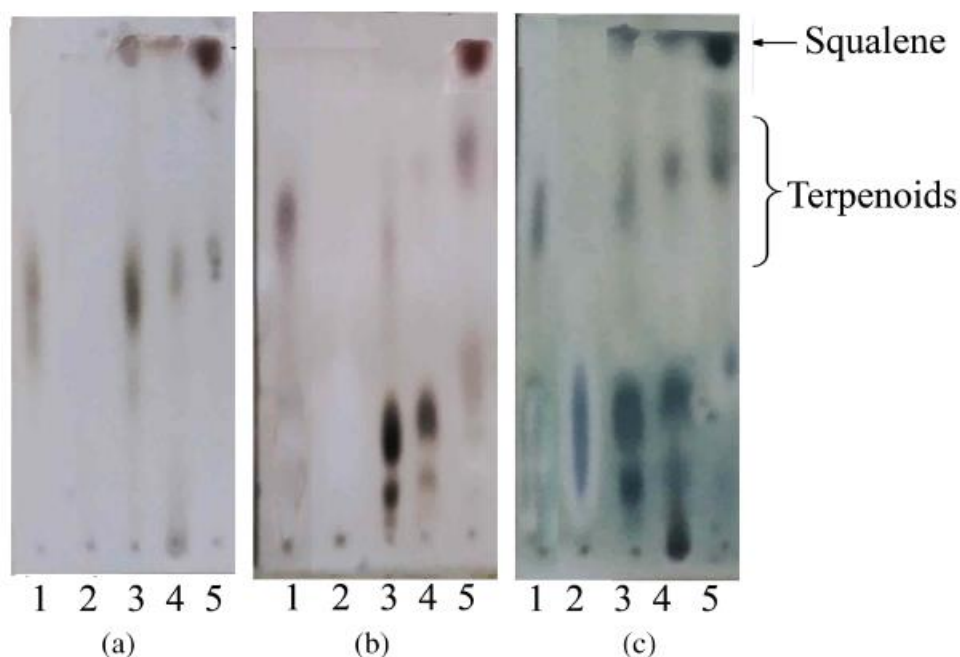


Рис. 3.1. Тонкошарова хроматограма екстрактів з насіння щиріці.

Цифрами позначено нанесені на пластину речовини:

1) есцин з плодів гірського каштану (90% чистоти), в якості речовини-свідка;

2) водний екстракт знежиреного насіння щиріці;

3) метанольний розчин екстракту, отриманого шляхом екстракції 70% метанолом знежиреного насіння щиріці;

4) метанольний розчин екстракту, отриманого шляхом екстракції 50% ізопропанолом знежиреного насіння щиріці;

5) метанольний розчин екстракту, отриманого шляхом екстракції 100% метанолом знежиреного насіння щиріці.

Буквами позначено реагенти якими проявляли хроматограми:

a) 20% етанольний розчин фосфорновольфрамової кислоти;

b) суміш, що містить 0,025 мл анісового альдегіду, 0,5 мл оцтової кислоти, 4,25 мл метанолу та 0,25 мл концентрованої сірчаної кислоти;

c) 5% етанольний розчин молібден-фосфорної кислоти.

В результаті виявили що, хоча вода або 1% розчин NaCl забезпечують найбільший вихід екстракту, тритерпенові речовини в водних екстрактах були відсутні, проте наявні у всіх спиртових екстрактах.

Найбільш оптимальним екстрагентом виявився 100% метанол, він забезпечував найменші втрати лектину при найбільшому процентному виході екстракту, з підтвердженням наявності тритерпенових речовин методом ТШХ.

3.2.7. Пошук оптимальної схеми для екстракції лектину і тритерпеноїдів.

Для отримання оптимального методу екстракції лектину та суми тритерпенових речовин із сировини ми використовували дві різні схеми:

(1) Знежирене борошно з насіння спочатку екстрагували 1% NaCl, і очищали лектин на колонці з афінним сорбентом, а висушені вичавки екстрагували метанолом для отримання тритерпеноїдів;

(2) Знежирене борошно з насіння спочатку екстрагували метанолом для екстракції тритерпенових речовин, а після висушування вичавок лектин екстрагували 1% NaCl та очищали на колонці з афінним сорбентом.

Екстракція водою видаляє з насіння набагато більше речовин, ніж спиртом, як видно в Табл. 3.1. Тому при екстракції знежиреного насіння водою або 1% NaCl, а потім 100% метанолом, спиртовий екстракт містив у 5,5 разів менше речовин за масою (0,58%), ніж при екстракції знежиреного насіння відразу 100% метанолом (3,2%) (Табл. 3.1.)

Враховуючи що, вода та 1% розчин NaCl не екстрагують (або екстрагують в незначній кількості) тритерпенові речовини з обезжиреного насіння щиріці, то, очищення лектину перед екстракцією тритерпенових сполук метанолом має перевагу, оскільки повністю зберігає активність лектину та дозволяє виділити тритерпенові сполуки щиріці, які не екстрагуються водою. Метанольний екстракт має меншу масу, але збагачений тритерпеновими

сполуками. Таким чином, запропоновану нами послідовність екстракцій "вода-метанол" можна розглядати як додатковий спосіб їх очищення.

3.2.8. Екстракція лектину

N-ацетил-D-галактозамін-специфічний лектин екстрагували 1% розчином хлориду натрію у співвідношенні сировина–екстрагент 1:10 за кімнатної температури з безперервним перемішуванням протягом 60 хвилин. Отриманий екстракт віджимали через щільну тканину з подальшим первинним очищенням для нанесення на афінний сорбент. Для цього екстракт підкислювали оцтовою кислотою до рН 4,0–4,5. Утворений осад баластного білка видаляли центрифугуванням або фільтруванням. Потім очищений екстракт підлужнювали до рН 7,5–8,0, а невеликий новоутворений осад видаляли центрифугуванням або фільтруванням і наносили на попередньо підготовлену колонку афінного сорбенту. Колонки об'ємом 100 мл достатньо для сорбції лектину з 1,0 кг насіння шириці. За правильних умов хроматографії сорбент повинен сорбувати 90 – 95 % лектину. Після пропускання екстракту з насіння шириці колонку промивали 0,1–0,5 М ацетатним або фосфатним буфером з рН 6,0–8,0 для зниження поглинання в елюаті. Десорбцію лектину з колонки проводили 0,2 М боратним буфером з рН 9,0–9,5, нагрітим до +40–50 °С. Такий спосіб десорбції лектину з афінної колонки зумовлений високою спорідненістю лектину до аборбенту та чутливістю лектину до сильнолужних (рН вище 10) та кислих розчинів (рН нижче 4,0). Поєднання високого рН з підвищеною температурою десорбує лектин з колонки краще, з меншим об'ємом, ніж при використанні одного з цих факторів. Десорбція лектину холодним лужно-боратним буфером призводить до виходу лектину в більш розведеному розчині, що вимагає більше часу та використання реагентів. Використання кислих буферних розчинів (наприклад, 1% оцтової кислоти) є небажаним, оскільки після ліофілізації лектин, отриманий таким чином, частково втрачає розчинність.

Фракції, що містили лектин, збирали, об'єднували та підсолювали сульфатом амонію з концентрацією солі 560 г/л. Осад відділяли центрифугуванням, розчиняли у воді та після діалізу проти 0,05 М фосфатного буфера з рН 7,0 наносили для очищення на колонку з DEAE- Тоуорpearl об'ємом $15 \pm 5,0$ мл, попередньо промиту тим самим буфером. Збирали фракції об'ємом 10 мл. Лектин за цих умов залишає колонку без затримки. Фракції, що містять лектин, об'єднували та осаджували сульфатом амонію з концентрацією солі 560 г/л. Утворений осад розчиняли у невеликому об'ємі води та ліофілізували після діалізу [97].

3.2.9. Аналіз лектину

Лектин взаємодіяв з N-ацетил-D-галактозаміном, N-ацетилнейраміною кислотою та D-глюкуроною кислотою. (Табл. 3.2.) Таблиця не включає вуглеводи з якими лектин не взаємодіє в кількості 100 ммоль (D-галактуронова кислота, D-галактоза, N-ацетил-D-глюкопіранозид, α - та β -метил-D-галактопіранозиди, D-глюкоза, D-маноза, L-рамноза, L-арабіноза, D-глюкозамін, L-фукоза, лактоза, трегалоза та мелібіоза), а також полісахариди та глікопротеїни (манан дріжджів, гуміарабік)

Таблиця 3.2.

Взаємодія лектину насіння щириці з вуглеводами та глікопротеїнами

№	Вуглеводи, глікопротеїни	Мінімальна інгібуюча концентрація 4-х гемаглютинуючих одиниць лектину
1	N-ацетил-D-галактозамін	50 ммоль
2	N-ацетилнейрамінова кислота	100 ммоль
3	D-глюкуронова кислота	100 ммоль
4	Трансферин	0,5%
5	Орозомукоїд	0,25%
6	Підщеплений муцин	0,004%
7	Десіалізований підщеплений муцин	0,015%
8	Фетуїн	0,002%

Вуглеводна специфічність лектину була детально вивчена [25], хоча не всі аспекти цієї взаємодії були досліджені. Ці дослідники показали, що ацетамідогрупа в положенні С-2 галактопіранози є дуже важливою для взаємодії вуглеводів з лектином.

Галактозні олігосахариди є значно кращими інгібіторами лектинової активності, ніж моносахариди. Наприклад, олігосахарид Gal- β 1-3GalNAc був у 232 рази кращим інгібітором, ніж N-ацетил-D-галактозамін. Сіалільований глікопротеїн NeuAc Структура α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -O-(CH₂)₈CO₂CH₃ була в 439 разів потужнішою, ніж N-ацетил-D-галактозамін.

Молекулярну масу поліпептидних ланцюгів лектину визначали електрофорезом у 15% SDS-PAGE з 0,1% додецилсульфатом натрію в буферному розчині Tris-HCl, рН 8,6 [98]. Як стандарт використовували суміш білків відомої молекулярної маси від Fermentas (Олайн, Латвія). Положення очищених лектинових субодиниць вказує на те, що їхня молекулярна маса становить 33 кДа (Рис. 3.2.).

Отриманий лектин був гомогенним при аналізі дисковим електрофорезом в лужній буферній системі (рН 8,9) (Рис. 3.2.).

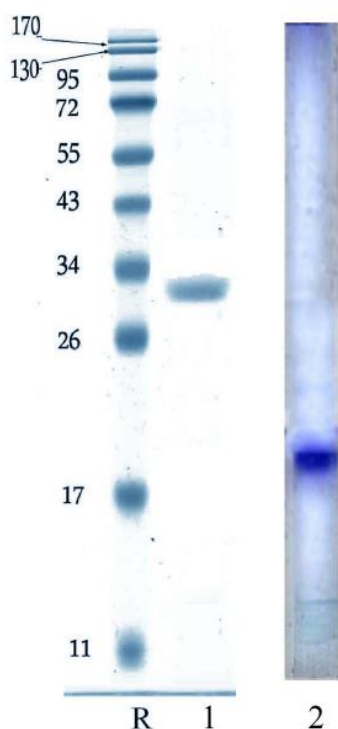


Рис 3.2. Електрофорез очищеного лектину насіння щиряці

Позначення:

R) суміш білків відомої молекулярної маси від Fermentas;

1) очищений лектин з насіння щиряці при рН 8,6

2) дисковий електрофорез очищеного лектину з насіння щиряці при рН 8,9

3.2.10. Екстракція тритерпенових речовин

Тритерпенові речовини екстрагували 100% метанолом при кімнатній температурі. Екстракцію проводили у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10 при постійному перемішуванні на механічній мішалці протягом 30 хвилин. Цю процедуру повторювали тричі. Отримані екстракти віджимали через марлю, центрифугували і фільтрували. Очищені екстракти об'єднували. Метанол відганяли до його вмісту в залишку 12–20%, після чого цей залишок обробляли етилацетатом, який додавали у співвідношенні 3:1, для очищення від пігменту. Після струшування цієї суміші етилацетатну (верхню) та метанольну фази

розділили, і сушили в сушильній шафі при температурі 55–65 °С до повного видалення розчинника.

Метанольний екстракт, отриманий після очищення етилацетатом, візуально не містив пігментів. Однак результати аналізів ТШХ та ГХ-МС показали, що тритерпеноїди містяться в обох фракціях приблизно в рівних пропорціях (41–50%). Тому виникає питання, чи доцільно очищати метанольний екстракт етилацетатом.

3.2.11. Ідентифікація сквалену і тритерпеноїдів за допомогою ГХ-МС

Ідентифікацію сквалену і тритерпеноїдів у метанольному екстракті проводили за допомогою ГХ-МС. У метанольному екстракті за допомогою ГХ-МС було виявлено 52,62% суми жирних кислот та 41,64% суми тритерпеноїдів. Основним компонентом метанольного екстракту був 24-гідрокси-3,4-секоланоста-4(28),8-дієн-3-нітрил ($C_{30}H_{49}NO$). Результати представлені в Табл. 3.3. і Рис. 3.3.-3.6.

Таблиця 3.3.

Хімічний склад метанольного екстракту з насіння щиріци

№	Субстанція	Час утримання	% від маси сухого залишку	
			метанольна фракція	етилацетатна фракція
1	Сквален	17,125	1,09	6,26
2	γ -ергостенол	20,360	–	0,42
3	5 α -стігмаст-7-ен-3 β -ол	21,252	–	0,32
4	Стігмаста-7,22-дієн-3-ол ($C_{29}H_{48}O$)	20,663	0,78	3,86
5	24-гідрокси-3,4-секоланоста-4(28),8-дієн-3-нітрил ($C_{30}H_{49}NO$)	22,138	39,77	39,19
–	Сумарний вміст терпеноїдів	–	41,64	50,05
6	Лауринова кислота	9,389	0,85	–
7	Пальмітинова кислота	12,291	4,04	10,52
8	Олеїнова кислота	13,427	8,96	23,61
9	Стеаринова кислота	13,552	1,14	3,34

10	Гліцерил трилаурат	17,785	15,36	–
11	Гліцерил тридеканоат	22,946	22,27	–
–	Сумарний вміст жирн. кислот	–	52,62	37,48
–	Сумарний вміст терпеноїдів і жирних кислот	–	94,26	87,54
–	–	–	метанольна фракція	етилацетатна фракція
–	% від маси насіння використаного для екстракції	–	1,39	0,36

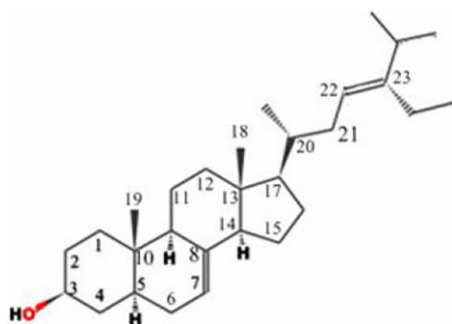


Рис 3.3. Стігмаста-7,22-дієн-3-ол

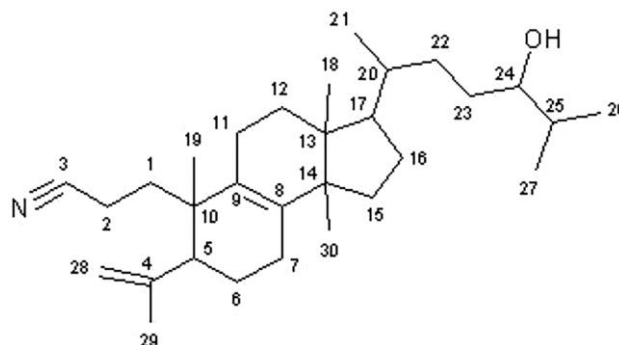


Рис 3.4. 24-гідрокси-3,4-секоланоста-4(28),8-дієн-3-нітрил

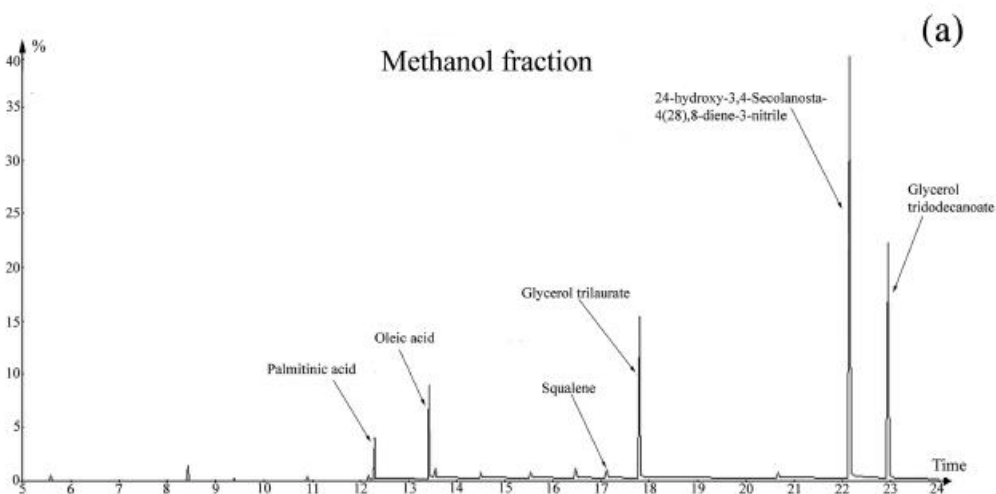


Рис.3.5. Хроматограма газового хроматографа метанольної фракції метанольного екстракту знежиреного насіння щиріці, очищеного етилацетатом.

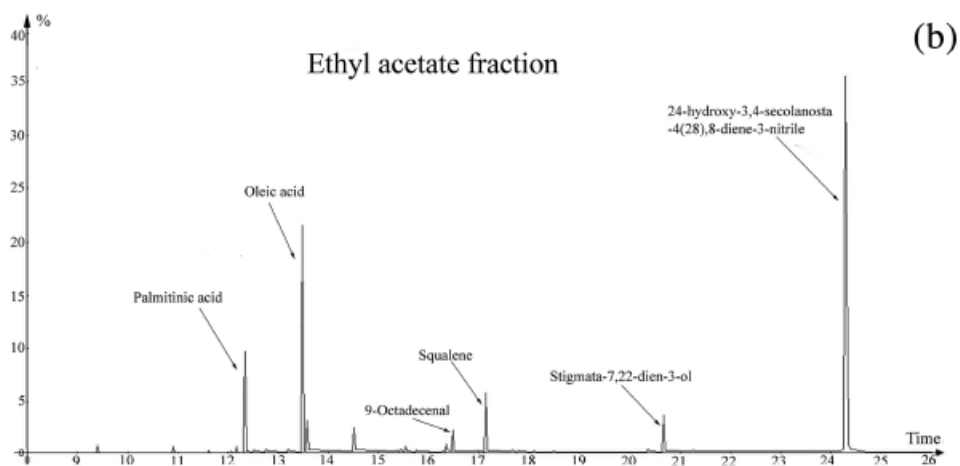


Рис.3.6. Хроматограма газового хроматографа етилацетатної фракції метанольного екстракту знежиреного насіння щириці, очищеного етилацетатом.

3.3. Розробка методики отримання біологічно-активних речовин з надземної частини *Amaranthus caudatus* L., яка залишається після одержання насіння.

Виведено низку сортів щириці, листя, стебла і суцвіття яких забарвлені у червоно-фіолетовий колір. Цей пігмент одержав назву амарантин. Він може бути використаний як натуральний харчовий барвник. Згідно даних літератури надземна частина рослини вміщує також багато аскорбінової кислоти, містить вуглеводи, амінокислоти, флавоноїди [99,100]. Тому рослину слід використовувати комплексно.

Метою роботи була розробка методики комплексної переробки надземної частини рослини, яка лишається після одержання насіння. З цією метою нами була випробувана розроблена нами методика комплексної переробки рослинної сировини, що вміщує флавоноїди (Додаток В) [101].

Для дослідження надземної частини щириці збір сировини здійснювали пізно восени (кінець жовтня) після обмолоту насіння.

3.3.1. Екстракція пігменту амарантину і полісахаридів

Висушену надземну частину *Amaranthus caudatus* L. після збору насіння подрібнювали на електромлинку, просівали через сито з діаметром отворів 1 мм., тричі екстрагували холодною водою (+4° – 8°C) у співвідношенні 1:10, при постійному перемішуванні протягом 1 год. Екстракт віджимали через марлю, центрифугували і фільтрували. Екстракти об'єднували. Об'єднаний екстракт брудно-фіолетового кольору, містив пігмент амарантин та високомолекулярні речовини (білки і полісахариди). Екстракт висушували в сушильній шафі при температурі 55-65 °С.

Речовини із цього екстракту розділяли іонообмінною хроматографією на колонці з DEAE-toyopearl. На сорбент, врівноважений 0,02 М фосфатним буфером, рН 7,2–7,6 наносили 5% водний розчин екстракту, і промивали цим же буферним розчином. Елюат розливали в пробірки Еппендорфа. Нейтральні полісахариди проходили без затримки, білки були елюйовані 0,2 М розчином NaCl, а пігмент амарантин елюйювався 1,0 М розчином NaCl (рН 7,6).

3.3.2. Екстракція хлорофілів і флавоноїдів

Шрот, що залишився після екстракції холодною водою висушували в сушильній шафі за температури 55–65 °С і екстрагували 70% етанолом в апараті Сосклета протягом 60 хвилин. Отриманий екстракт центрифугували і фільтрували. Розчинник відганяли, а сконцентрований екстракт сушили в сушильній шафі за температури 55–65 °С. Одержували екстракт жовто-зеленого кольору, який містив хлорофіли та можливо, фенольні речовини і флавоноїди. Хлорофіли відділяли від флавоноїдів шляхом екстракції петролейним ефіром після висушування етанольної витяжки. Одержували залишок, який аналізували на наявність флавоноїдів. В якості позитивного контролю використовували спиртовий розчин рутину. Одержаний екстракт давав реакцію з FeCl₃ та з лугами, ціанідина реакція була негативною. Тонкошарова хроматографія

(ТШХ) на пластинках силікагелю у системі розчинників н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2) не виявила рутину. Проявлення пластинки ТШХ парами йоду давало пляму, що не співпадала з рутином.

За реакцію з FeCl_3 кількісний вміст флавоноїдів був оцінений у 0,1%.

Висновки до розділу 3

Ми розробили схему отримання жирної олії, сквалену, лектину та суми тритерпенових речовин з насіння *Amaranthus caudatus* L. Тритерпеноїди насіння щириці нерозчинні у воді та не екстрагуються з насіння водою та 1% розчином NaCl, тому, найімовірніше, вони не відіграють антинутрієнтної ролі в кулінарії. Їх можна екстрагувати з вичавок насіння метанолом після екстракції лектину 1% розчином NaCl. Лектин чутливий до осадження спиртом, а тритерпенові сполуки насіння нерозчинні у воді. Тому лектин слід екстрагувати після знежирення насіння, а тритерпенові речовини – після отримання лектину. Така послідовність операцій призводить до збереження активності лектину та додаткового очищення тритерпеноїдів насіння від водорозчинних речовин. Подібна схема отримання біологічно активних речовин також дозволяє отримати суму водорозчинних речовин насіння, багатих на амінокислоти та вуглеводи, які без затримки проходять через колонку афінного сорбенту. Таким чином, розроблена нами технологічна схема очищення біологічно активних речовин насіння щириці може сприяти його більш раціональному використанню.

Розроблена нами методика комплексної переробки надземної частини щириці хвостатої є ефективна для одержання пігменту та полісахаридів і білків, але надто пізній збір сировини приводить до дуже низького виходу флавоноїдів. Ми звернули увагу також на те, що надземна частина рослини після заморозків втрачає природний колір і очевидно, стає непридатною для одержання пігменту амарантину. Таким чином, якщо потрібно екстрагувати

максимальну кількість флавоноїдів з листків щиріці, кращим періодом збору сировини є фенофаза бутонізації і початку цвітіння.

Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [101-105]

Додатки В, Г.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ПЛОДОВИХ ТІЛ ГРИБІВ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ СИРОВИННИХ ДЖЕРЕЛ СКВАЛЕНУ

4.1. Мета дослідження

При попередніх дослідженнях під час аналізу гексанового екстракту, отриманого з плодових тіл *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., (Рис. 4.1.) що належить до ксилотрофних грибів, використовуючи ГХ-МС ми виявили, що вміст сквалену в екстракті *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst. становить 12,59% (Табл 4.1.), що перевищує вміст сквалену в олії щиріці (4,5-7%) отриманий нами в попередніх дослідженнях.



Рис. 4.1. Тироміцес білосніжний (*Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst.) на стовбурі вільхи

Таблиця 4.1.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції плодових тіл *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst.

№	Назва речовини	% вміст	Ступінь достовірності
1	Пальмітинова кислота	7,29	99

2	Дибутілфталат	2,58	83
3	Етиловий естер пальмітинової кислоти	1,35	96
4	Олеїнова кислота	21,25	99
5	Етиллінолеат	1,41	99
6	Етил олеат	2,68	95
7	Ди-(2-етилгексил)фталат	8,65	91
8	Сквален	12,59	98
9	Холестерин	3,45	99
10	Ергоста-5,22-дієн-3-ол	11,41	95
11	Ергост-7-єн-3-ол	3,33	92
12	Фрієдоолеан-8-єн-3-он	8,16	93
13	4,7-метано-1Н-інден	1,70	91
14	D-фрідулін-14-єн-3-он	2,83	76
15	5-фторнікотинава кислота	11,35	50

Тому ми вирішили дослідити вміст сквалену в ряді інших філогенетично близьких грибів, як потенційних сировинних джерел сквалену, а також дослідити, як змінюється його кількість протягом вегетації плодових тіл грибів.

В дослідженні було проаналізовано ліпофільні екстракти, отримані з плодових тіл 21 виду. Один вид *Sarcoscypha coccinea* (Jacq.) Lambotte належить до класу *Pezizomycetes*, інші 20 видів належать до класу *Agaricomycetes* а саме: *Boletus subtomentosus* L., *Cantharellus cibarius* Fr., *Coriolus versicolor* (L.) Quéł., *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, *Hydnum repandum* L., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Lycoperdon perlatum* Pers., *Lycoperdon pyriforme* Schaeff., *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Polyporus badius* (Pers.) Schwein., *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr., *Postia stiptica* (Pers.) Jülich, *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst., *Russula virescens* (Schaeff.) Fr., *Scleroderma aurantium* (L.) Pers., *Suillus luteus* (L.) Roussel, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst..

4.2. Збір сировини

Сировину збирали самостійно в літньо-осінній період з дикорослих форм у Львівській області, переважно в Стрийському районі. Також використовувалася культивована форма *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromycel PL132 яка була взята з ТОВ "Добрий Гриб" (Львівська область, село Лавриків).

Для більшості видів дикоросла сировина була представлена одним-двома зразками. Для грибів видів: *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Lycoperdon perlatum* Pers. була зібрана сировина на різних стадіях зрілості. Для цього щотижня проводилися спостереження за потенційними місцями зростання цих грибів. У тому ж місці збору молоді плодові тіла збирали через тиждень після їх появи, стиглі плодові тіла – через два тижні, а перестиглі плодові тіла – через три тижні. Окрім врахування часу збору, додатково проводився поділ на молоді, стиглі та перестиглі плодові тіла шляхом оцінки їх морфологічного стану. Наприклад, молода березова губка (*Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui) була білою, м'якою та легко розламувалася руками. Стиглі плодові тіла потрібно було розрізати ножом. Перестиглі плодові тіла були здерев'янілі, і їх було важче розрізати ножом. (Рис. 4.2.)



Рис. 4.2. Трутовик березовий (*Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui) на стовбурі берези

У випадку з *Lycoperdon perlatum* Pers. поділ на три групи за ступенем зрілості проводився після зрізання плодових тіл та оцінки кольору їхньої внутрішньої частини. Молоді плодові тіла були чисто білими, стиглі – жовтуватими всередині, а перестиглі набували сіруватого кольору. (Рис. 4.3.)



Рис. 4.3. Плодові тіла *Lycoperdon perlatum* Pers. на різних стадіях зрілості

Культивована форма *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromycel PL132 також була представлена зразками на різних стадіях зрілості.

4.3. Приготування екстракту

Після висушування плодові тіла подрібнювали в електричному млинку та просіювали через сито з розміром отворів 0,5 мм. Подрібнений порошок (30-50 г.) екстрагували в апараті Сокслета петролейним ефіром з температурою кипіння 40-70 °С протягом години. Екстракт центрифугували і фільтрували. Далі розчинник відганяли, а сконцентрований екстракт сушили в сушильній шафі при температурі 55-65 °С. Отриманий сухий екстракт зважували та розчиняли в гексані або циклогексані (залежно від подальших дій) у співвідношенні екстракт грибів – гексан/циклогексан 1:10.

4.4. Розділення екстракту на фракції колоноковою рідинною хроматографією

Якщо аналіз гексанового екстракту за допомогою ГХ-МС був неможливим, його розділяли на фракції рідинною хроматографією на силікагелі, з метою очищення сквалену від інших екстрагованих речовин.

Розчин циклогексану центрифугували, а прозорий супернатант наносили на колонку з силікагелем (40-160 мкм, компанія Chemapol, Чехія), попередньо промиту циклогексаном. Після потрапляння розчину в гель, речовини, адсорбовані на колонці, елюювали циклогексаном, а ті речовини, що не елюювалися за заданих умов, – хлороформом. Розчинник випарювали, а залишок зважували. Сквален елюювався в перших фракціях.

4.5. Підтвердження наявності сквалену

Розчини ліпофільних фракцій досліджуваних грибів та 1% розчин сквалену, як зразок для порівняння, наносили на пластини Silufol UV розміром 14×12 см. Як систему розчинників використовували гексан – хлороформ (1:1), що дало найкращі результати серед протестованих систем розчинників. Після підняття системи розчинників на висоту 11–11,5 см пластину виймали з хроматографічної камери, сушили в сушильній шафі при температурі $+60$ °C до вивітрювання розчинників, і поміщали в камеру з йодом. Сквален проявлявся у вигляді жовтокоричневих плям з $R_f = 0,9$, також вимірювали показник заломлення ($D = 1,499$) та йодне число (380). Але найбільш точні результати вдалося отримати завдяки ГХ-МС.

4.6. Результати досліджень

Отримані результати дозволили встановити, що загальна кількість ліпофільних речовин, що містяться в більшості досліджених грибів, була невеликою та коливалася від 0,15% до 2%. Водночас вона коливається в дуже

великих межах, від 0,14% у *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. до 14,72% у *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat. (Табл 4.2.).

Таблиця 4.2.

Відсотковий вміст ліпофільних речовин екстрагованих з плодових тіл.

Родина	Вид	Маса ліпофільних речовин у висушеній сировині	
<i>Sarcoscyphaceae</i>	<i>Sarcoscypha coccinea</i> (Jacq.) Lambotte	1,14 ± 0,09	
<i>Polyporaceae</i>	<i>Tyromyces chioneus</i> (Fr.) P. Karst.	0,45 ± 0,04	
		0,30 ± 0,05	
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (Jacq.) P. Karst.	0,59 ± 0,06	
	<i>Coriolus versicolor</i> (L.) Quéf.	0,26 ± 0,05	
	<i>Polyporus badius</i> (Pers.) Schwein.	0,44 ± 0,06	
	<i>Polyporus squamosus</i> (Huds.) Fr.	1,21 ± 0,12	
<i>Fomitopsidaceae</i>	<i>Postia stiptica</i> (Pers.) Jülich	1,46 ± 0,14	
	<i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) B.K. Cui	1,35 ± 0,12	
		0,85 ± 0,09	
<i>Physalacriaceae</i>	<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	1,89 ± 0,12	
	<i>Mucidula mucida</i> (Schrad.) Pat.	9,29 ± 0,52	
<i>Pleurotaceae</i>		14,72 ± 0,62	
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.		1,25 ± 0,12
			0,96 ± 0,11
			0,91 ± 0,12
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm. sort <i>Euromycel PL132</i>		0,21 ± 0,03
			0,14 ± 0,03
		0,17 ± 0,05	
<i>Agaricaceae</i>	<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff.	0,75 ± 0,08	
	<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	1,12 ± 0,13	
<i>Physalacriaceae</i>	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	1,03 ± 0,01	
<i>Hydnaceae</i>	<i>Hydnum repandum</i> L.	3,44 ± 0,29	
		2,74 ± 0,24	

<i>Cantharellaceae</i>	<i>Craterellus cornucopioides</i> (L.) Pers.	3,82 ± 0,37
	<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	2,41 ± 0,22
<i>Russulaceae</i>	<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	2,48 ± 0,23
<i>Boletaceae</i>	<i>Boletus subtomentosus</i> L.	3,28 ± 0,33
<i>Suillaceae</i>	<i>Suillus luteus</i> (L.) Roussel	4,76 ± 0,43
<i>Sclerodermataceae</i>	<i>Scleroderma aurantium</i> (L.) Pers.	1,22 ± 0,32

Аналіз екстрактів грибів проводили за допомогою ГХ-МС. Для екстрактів грибів, суміш яких не була надто складною, можна було отримати результати без додаткової обробки. Такі екстракти були отримані з грибів, що належать до родини *Polyporaceae*, тоді як екстракти інших родин грибів у більшості випадків не могли бути проаналізовані без додаткового розділення на фракції колонковою хроматографією (Табл. 4.3.).

Таблиця 4.3.

Вміст сквалену в ліпофільних екстрактах грибів

Вид	% вміст сквалену	Ступінь надійності згідно ГХ-МС
<i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) B.K. Cui	6,06	96
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	7,73	96
<i>Hydnum repandum</i> L.	0,46	91
<i>Craterellus cornucopioides</i> (L.) Pers.	0,51	98
<i>Mucidula mucida</i> (Schrad.) Pat.	2,70	95
<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff.	2,81	80
<i>Scleroderma aurantium</i> (L.) Pers.	5,03	87
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	2,86	97
<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	1,05	93
<i>Риснопорус циннабаринус</i> (Jacq.) P. Karst.	2,51	93
<i>Postia stiptica</i> (Pers.) Jülich	5,19	97
<i>Tyromyces chioneus</i> (Fr.) P. Karst.	12,59	98
<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	6,08	99
<i>Coriolus versicolor</i> (L.) Quéf.	3,75	94
<i>Polyporus squamosus</i> (Huds.) Fr.	0,53	95

<i>Polyporus badius</i> (Pers.) Schwein.	3,25	99
<i>Sarcoscypha coccinea</i> (Jacq.) Lambotte	5,32	98

Згідно з даними ГХ-МС, сквален не було виявлено в ліпофільних екстрактах плодових тіл *Russula virescens* (Schaeff.) Fr., *Boletus subtomentosus* L., *Suillus luteus* (L.) Roussel та *Cantharellus cibarius* Fr. (Рис. 4.4.)



Рис. 4.4. *Russula virescens* (Schaeff.) Fr., *Boletus subtomentosus* L., *Suillus luteus* (L.) Roussel та *Cantharellus cibarius* Fr.

Таким чином, з точки зору отримання сквалену, гриби, що належать до порядків *Polyporales* та *Agaricales*, становлять найбільший інтерес, оскільки вміст сквалену в їх ліпофільному екстракті часто вищий, ніж в олії більшості рослин, включаючи олію щиріці (4,5–7,0%) [102]. Виходячи з отриманих результатів, ліпофільні екстракти *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui, *Tyromyces chioneus* (Fr.) Р. Karst. та *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Р. Kumm. можуть бути перспективними джерелами для отримання сквалену. Однак слід зазначити, що дані, здебільшого базувалися на аналізі лише одного зразка сировини, коли були отримані з двох різних зразків, вони дещо відрізнялися. Крім того, їх кількість у зразках сировини, зібраних з різних місць, теж варіювалася. За нашими спостереженнями, вона, найімовірніше, залежить від стадії дозрівання плодових тіл грибів. Також можливо, що на кількісний та якісний склад екстрактивних речовин впливають різні фактори навколишнього середовища,

такі як температура повітря, вологість, мінеральний склад ґрунту, інтенсивність сонячної радіації. Існує відповідна література щодо впливу цих факторів на ріст культивованих грибів, зокрема, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. [51,106,107].

Тому ми провели додаткові дослідження, щоб встановити залежність кількості сквалену в ліпофільному екстракті від стадії розвитку плодових тіл *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. та *Lycoperdon perlatum* Pers. (Табл. 4.4.).

Таблиця 4.4.

Зміни в кількості сухого екстракту та вмісту в ньому сквалену залежно від стадії зрілості плодових тіл

Вид	Стадія зрілості	% маси сухого екстракту від маси висушеної сировини	% вміст сквалену в екстракті	Вихід сквалену в мг зі 100 г висушеної сировини
<i>Tyromyces chioneus</i> (Fr.) P. Karst.	молоді	0,72	11,34	81,6
	зрілі	0,64	6,00	38,4
	перезрілі	0,61	1,38	8,4
<i>Mucidula mucida</i> (Schrad.) Pat.	молоді	9,43	4,24	399,8
	зрілі	10,31	3,01	310,3
	перезрілі	15,82	1,78	281,6
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	молоді	1,24	2,86	35,5
	зрілі	0,95	1,39	13,2
	перезрілі	0,24	0,32	0,8
<i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) B.K. Cui	молоді	2,04	5,34	108,9
	зрілі	1,48	1,23	18,2
	перезрілі	1,23	0,83	10,2
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	молоді	0,38	8,47	32,2
	зрілі	0,17	2,09	3,6
	перезрілі	0,08	1,78	1,4
<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	молоді	1,34	1,02	13,7
	зрілі	0,99	1,07	10,6
	перезрілі	0,63	1,7	10,7
<i>Amaranthus caudatus</i> L.		4,2	4,5-7,0	189-294

Результати, показують, що для всіх видів грибів (крім *Lycoperdon perlatum* Pers.) вміст сквалену зменшувався зі старінням плодових тіл. Найвищий вміст сквалену ми спостерігали в ліпофільному екстракті *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst.

Проте, якщо перерахувати вміст сквалену на 100 г. висушеної вихідної сировини, можна зробити висновок, що лише *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat. (Рис. 4.5.) може серйозно конкурувати з насінням щиріці як джерело сквалену.



Рис 4.5. *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat.

Цей гриб характеризується дуже високим вмістом ліпофільних речовин, кількість яких збільшується під час росту плодових тіл, на відміну від усіх інших аналізованих видів грибів. Хоча концентрація сквалену в старіших плодових тілах *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat. зменшується, це зниження не таке сильне, як в інших грибів.

Також заслуговують на увагу *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst. та *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй. Молоді плодові тіла цих грибів мають досить значний вміст сквалену. Він вищий, ніж у *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., але загальна кількість екстрагованих ліпофільних речовин у 5-25 разів нижча.

Завдяки цьому питомий вміст сквалену в цій сировині нижчий. Крім того, під час старіння плодових тіл цих грибів спостерігається 10-кратне зниження загальної кількості сквалену, тоді як у *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat. таке зниження становить лише 30%. Згідно з даними ГХ-МС, основна частина ліпофільного екстракту з плодових тіл *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat. складається з вищих жирних кислот (Рис. 4.4.)(Табл.4.5.).

Таблиця 4.5.

Хімічний склад плодових тіл *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat.
за даними ГХ-МС

Стадія зрілості	Сумарна кількість ідентифікованих речовин	Основні речовини	% вміст
молоді	16	Ундециленова кислота	–
		Лауринова кислота	23,34
		Пальмітинова кислота	11,46
		Олеїнова кислота	37,52
		Стеаринова кислота	4,88
		Лінолева кислота	15,78
		Сквален	4,24
зрілі	26	Ундециленова кислота	3,90
		Лауринова кислота	11,64
		Пальмітинова кислота	10,50
		Олеїнова кислота	22,77
		Стеаринова кислота	4,24
		Лінолева кислота	15,38
		Ейкозан	3,67
		Докозан + трикозан + гептадекан	7,40
		Сквален	3,01
перезрілі	18	Ундециленова кислота	1,78
		Лауринова кислота	15,91
		Пальмітинова кислота	11,41
		Олеїнова кислота	45,52
		Стеаринова кислота	5,24
		Лінолева кислота	–
		Ейкозан	4,35
		Докозан + трикозан + гептадекан	3,99
		Сквален	1,78

Ненасичені жирні кислоти (олеїнова та ліноленова) складають близько половини всього асортименту цих кислот. Зі старінням плодових тіл вміст ненасичених жирних кислот зменшується.

4.7. Водні екстракції грибів

Шрот, який залишився після екстракцій в петролейному ефірі, висушували, зважували і екстрагували 0,9% розчином NaCl або дистильованою водою в співвідношенні 1:10. Екстракцію проводили протягом ночі при кімнатній температурі або в сушильній шафі при температурі 55-65 °С. Готові екстракти віджимали через марлю, і фільтрували.

За виключенням *Русноporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst. і *Postia stiptica* (Pers.) Jülich (Рис 4.6.) всі інші екстракти залишилися мутними, тому їх декілька раз центрифугували по 30 хв. Після багаторазового центрифугування більшість з них стали прозорими, за виключенням *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill і *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (Рис 4.6.). Окремо варто відзначити значну кількість слизу в екстракті Дощовика грушеподібного (*Lycoperdon pyriforme* Schaeff.) і в меншій степені в Дощовика несправжнього (*Scleroderma aurantium* (L.) Pers.).

Очищені від залишків грибів екстракти виявилися сильно забарвленими:

- екстракти *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. – чорного кольору;
- екстракти *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Русноporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst. і *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. – буро-коричневого кольору різної інтенсивності;
- екстракти *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui і *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. – жовтого кольору різної інтенсивності;
- екстракти *Postia stiptica* (Pers.) Jülich – світло-жовтого.



Рис. 4.6. *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst., *Postia stiptica* (Pers.) Jülich та *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr.

Для виділення з екстракту високомолекулярних сполук їх осаджували. Ми пробували два способи осадження:

– амонієм сульфатом в співвідношенні на 1 мл екстракту 0,6 г амонію сульфату при помішуванні до повного розчинення амонію сульфату. Проте цей метод потребував проведення діалізу або гель-хроматографії для очищення високомолекулярних сполук від сульфату амонію;

– 96% етанолом в морозильній камері при температурі $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в співвідношенні на 1 мл екстракту 2 мл етанолу. Даний спосіб виявився найбільш швидким і дозволяв отримати значну кількість осаду, тому переважно саме його ми і використовували.

Осаджену спиртом фракцію відділяли центрифугуванням. Отримані розчини зливали, осад повторно розчиняли в 0,9% водному розчині NaCl і повторювали процедуру декілька раз. Отриманий осад промивали спочатку етанолом, потім метилетилкетонем або ацетоном і в останню чергу петролейним ефіром, після кожного промивання центрифугували. В результаті отримали частково (хоч і не повністю) очищену від барвників фракцію водорозчинних високомолекулярних сполук плодових тіл грибів.

Дану фракцію перевіряли на наявність ферментів. На альфа-галактозидазу і бета-галактозидазу результат позитивний хоча і не завжди чітко виражений. На бета-глюкозидазу і бета-глюкозамінідазу результат позитивний і чіткий. (Табл. 4.6.)

Результати виявлення глікозидаз у екстрактах з плодових тіл грибів

№	Водні екстракти з плодових тіл грибів	Фермент			
		α -галактозидаза	β -галактозидаза	β -глюкозидаза	β -глюкозамінідаза
1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	+	+	+++	++
2	<i>Postia stiptica</i>	+	+	++	++
3	<i>Laetiporus sulphureus</i>	+	++	+++	+++
4	<i>Polyporus squamosus</i>	+	++	+++	+++
5	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	+	+	++	++
6	<i>Scleroderma aurantium</i>	+	+	++	++
7	<i>Pleurotus ostreatus</i>	+	++	+++	++
8	<i>Fomitopsis betulina</i>	+	+	+++	++

Висока активність α - та β -галактозидаз та β -глюкозидази є характерною для дереворуйнуючих грибів, так як вони руйнують целюлозу та геміцелюлози деревних порід, на яких ростуть ці гриби, що призводить до деструкції деревини. Висока активність β -глюкозамінідази пояснюється скоріш за все участю цього фермента у катаболізмі хітину. Цей фермент у рослин зустрічається дуже рідко, скоріш за все, у ньому рослинним організмам немає необхідності через відсутність хітину у клітинній стінці рослин.

Висушений і зважений шрот після водної екстракції ми піддавали екстракції в спиртах, переважно використовували метанол, 70%, 80%, 96% етанол і ізопропанол, проте вихід спиртових екстрактів з грибів після отримання ліпофільних і водних екстрактів був незначний. Тому дослідження спиртових екстракцій ми практично не проводили.

4.8. Порівняння хімічного складу ліпофільних екстрактів *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. та *Scleroderma aurantium* (L.) Pers.

Scleroderma aurantium (L.) Pers. (Рис. 4.7.) іноді помилково збирають замість їстівних видів *Lycoperdon* (*Lycoperdon pyriforme* Schaeff. (Рис. 4.8.), *Lycoperdon perlatum* Pers., *Lycoperdon umbrinum* Pers., *Lycoperdon pratense* Pers.).



Рис 4.7. Дощовик несправжній (*Scleroderma aurantium* (L.) Pers)



Рис 4.8. Дощовик грушоподібний (*Lycoperdon pyriforme* Schaeff.) на різних стадіях зрілості

Також види *Scleroderma* можуть бути сплутані з трюфелями недосвідченими грибниками. Вживання видів *Scleroderma* може спричинити шлунково-кишкові розлади у людей і тварин, а деякі люди можуть відчувати сльозотечу, риніт та ринорею, а також кон'юнктивіт від контакту з його спорами. Згідно з іншими даними, вживання грибів роду *Scleroderma* викликає мускаринові симптоми з боку нервової системи. Природа отруйної речовини не визначена. Однак вона не зникає при кип'ятінні грибів та зливанні відвару. Це свідчить про те, що ця речовина нерозчинна у воді та може витримувати температуру не менше 100 °С, а також може бути ліпофільною.

Після висушування плодів тіла подрібнювали, просіювали через сито з розміром отворів 0,5 мм. Отриманий порошок повторно зважували і екстрагували в апараті Сокслета петролейним ефіром з температурою кипіння 40-70 °С протягом години. Екстракт центрифугували, фільтрували, розчинник відганяли, а сконцентрований залишок сушили в сушильній шафі при температурі 55-65 °С. Отриманий сухий екстракт зважували та розчиняли в гексані. Після розчинення його аналізували за допомогою газової хроматографії-мас-спектрометрії (ГХ-МС).

Вага висушених плодівих тіл *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. становила $10,58 \pm 0,45\%$ від ваги свіжозібраних. Вага висушених плодівих тіл *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. становила $21,34 \pm 0,55\%$, що є аномально високим показником для грибів відділу *Basidiomycota*. Маса ліпофільних речовин (% від маси висушеної сировини) для *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. становила 0,75%, а для *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. – 1,22%. ГХ-МС виявила 14 речовин у *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. та 25 речовин у *Scleroderma aurantium* (L.) Pers.. У ліпофільному екстракті *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. було виявлено понад 68% вищих жирних кислот, зокрема, вміст лінолевої кислоти становив 48,37%. Вміст стероїдів (ергоста-5,7,22-трієн-3-олу та ергоста-5-єн-3-олу) становив 15,04%. У *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. вміст жирних кислот становив $\approx 30\%$, а вміст ергоста-5,7,22-трієн-3-олу – 25,99%. Серед токсичних компонентів

ліпофільного екстракту *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. було виявлено 4-ціанотіопіран та о-крезол. Їх вміст становив 1,82% та 2,74% відповідно від загальної маси екстракту.

Зроблено висновок, що ліпофільний екстракт з плодових тіл *Scleroderma aurantium* (L.) Pers. не містить значної кількості високотоксичних компонентів, а їхня загальна маса в ліпофільному екстракті недостатня для прояву такої токсичної дії, як у цих грибів.

4.9. Дослідження *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill і *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй на вміст амінокислот

Висушені плодові тіла подрібнювали в електричному млинку та просіювали через сито з розміром отворів 0,5 мм. Подрібнені плодові тіла екстрагували в апараті Сокслета 70% етанолом протягом 2 годин. Екстракт центрифугували і фільтрували. Розчинник відганяли, а сконцентрований екстракт сушили в сушильній шафі при температурі 55-65 °С. Отриманий сухий екстракт зважували. Кожний водно-етанольний екстракт після цього фракціонували органічними розчинниками у такій послідовності: хлороформ → петролейний ефір → вода → ізопропанол. Кожну екстракцію з одержаного залишку здійснювали щонайменше тричі, контролюючи екстракцію візуально по обезбарвленню екстрагенту. Розчинники з екстрактів відганяли. залишки допарювали в сушильній шафі. зважували на аналітичних вагах. Результати цих зважувань представлені в табл. 4.7.

Таблиця 4.7.

Результати зважувань в процесі аналізу *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill і *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй на вміст амінокислот

Сировина	<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Fomitopsis betulina</i>
Маса сировини (г.)	35,2	20,0

Маса етанольного екстракту(г.)		1,436 ± 0,07	2,877 ± 0,14
% вихід сухого залишку від маси сировини		4,08 ± 0,20	14,39 ± 0,71
Співвідношення фракцій етанольного екстракту (%)	Хлороформ	47,79 ± 2,38	56,25 ± 2,81
	Петролейний ефір	3,55 ± 0,17	1,29 ± 0,06
	Дистильована вода	37,89 ± 1,88	29,69 ± 1,48
	Ізопропанол	3,92 ± 0,19	4,20 ± 0,21
	Сумарний вміст	93,15 ± 4,65	91,43 ± 4,57

Виявлення амінокислот та їх кількісне визначення здійснювали за допомогою нінгідринової реакції. Використовували 0,5% розчин нінгідрину в 90% етанолі з додаванням 0.1 М цитратного буферного розчину (рН 6.0). До 0.2 мл досліджуваного розчину додавали 1 мл розчину нінгідрину і поміщали на 10 хв на водяну баню (+70 °С). Після цього суміш охолоджували і вимірювали оптичну густину при $\lambda = 574$ нм на спектрофотометрі СФ-56. Калібрувальний графік будували за відомими концентраціями DL- α -аланіну. Результати представлені в табл. 4.8.

Таблиця 4.8.

Вміст амінокислот в різних фракціях *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill і *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui

Плодові тіла грибів та їх фракції	Вміст амінокислот (в %)
<i>Laetiporus sulphureus</i> (екстракт)	11,5±0,5
хлороформна фракція	14,4±0,7
петролейно-ефірна фракція	0,0
водна фракція	6,2±0,3
ізопропанольна фракція	4,7±0,2
<i>Fomitopsis betulina</i> (екстракт)	8,5±0,4
хлороформна фракція	0,0
петролейно-ефірна фракція	4,1±0,2
водна фракція	7,5±0,3
ізопропанольна фракція	5,2±0,2

Для виявлення амінокислот на ТШХ водно-спиртові екстракти та їх фракції наносили на пластику Silufol UV 254. паралельно наносили розчини

відомих амінокислот і хроматографували в системі бутанол-оцтова кислота-вода (5:1:2). Після проведення хроматографії пластинку висушували, обприскували 0,5% спиртовим розчином нінгідрину, поміщали у сушильну шафу при +70 °C на 30 хв. після чого амінокислоти проявлялись на пластинці у вигляді червоно-фіолетових плям.

Найкраще розділення продемонструвала ізопропанольна фракція з такими амінокислотами-свідками як цистеїн, серин і метіонін. Відповідні плями обох досліджуваних зразків, які знаходилися навпроти речовин-свідків, зшкрябували і елюювали в 70% етанолі. Розчини центрифугували, супернатант відділяли і фільтрували. Отримані розчини аналізували на високоефективному рідинному хроматографі-мас-спектрометрі Agilent 1260 Infinity II. Спектроскопія підтвердила наявність цистеїну (М.м. 121), серину (М.м. 105) і метіоніну (М.м. 149). Спектри досліджуваних зразків представлені в додатку Е.

Висновки до розділу 4

Встановлено, що вміст сквалену в ліпофільних екстрактах з плодових тіл *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. та *Postia stiptica* (Pers.) Jülich може перевищувати вміст сквалену в жирній олії з насіння *Amaranthus caudatus* L. Однак маса ліпофільного екстракту, отриманого з висушених плодових тіл цих грибів, є невеликою. Також вміст сквалену в плодових тілах на різних стадіях розвитку, як показали дослідження, проведені на ксилотрофних грибах *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., зменшується в міру дозрівання плодових тіл цих грибів. Водночас вихід ліпофільного екстракту з плодових тіл *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat. є аномально високим, 9-15% та зростає в процесі їх дозрівання Цей гриб характеризується дуже високим вмістом ліпофільних речовин, кількість яких збільшується під час росту плодових тіл, на відміну від усіх інших аналізованих

видів грибів. Хоча концентрація сквалену в старіших плодових тілах *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat. зменшується, це зниження не таке сильне, як в інших грибів.

Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [108,109].

РОЗДІЛ 5

ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ЗРІЛОСТІ ПЛОДОВИХ ТІЛ *LAETIPORUS SULPHUREUS*, *PLEUROTUS OSTREATUS*, *FOMITOPSIS BETULINA*

5.1. Дослідження *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

Досліджували ліпофільні речовини плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (*Aphyllorphorales*, *Polyporaceae*), екстраговані петролейним ефіром, зібраних на різних стадіях розвитку. Для аналізу ліпофільних речовин було використано метод газової хроматографії-мас-спектрометрії (ГХ-МС).

Для отримання біологічно активних речовин деякі дослідники використовували матеріал, вирощений на живильному середовищі [110], або плодові тіла, зібрані в природі, але стадії їх розвитку в більшості випадків не були вказані [111-113], або використовували суміш плодових тіл різного ступеня зрілості [114], що призводить до дуже великої розбіжності як в асортименті, так і в кількості отриманих речовин.

Метою цього дослідження було вивчення динаміки змін хімічного складу ліпофільного екстракту плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill протягом їх вегетації (молодих, зрілих та перестиглих).

5.1.1. Збір сировини *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

Від початку появи плодових тіл гриба *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill на стовбурах дерев до зупинки їх росту та розвитку проходить 3-4 тижні. Візуально можна виділити 4 стадії їх розвитку: молоді без розвиненого гіменофору, зрілі з незрілими спорами, зрілі зі зрілими спорами, а також перезрілі гриби, що зазнають руйнування. Плодові тіла на різних стадіях розвитку морфологічно дещо відрізняються (Рис. 5.1.).



1

2

3

4

Рис. 5.1. Зовнішній вигляд плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill залежно від ступеня зрілості

1 – молоді; 2 – зрілі з незрілими спорами; 3 – зрілі зі зрілими спорами; 4 – перезрілі

Плодові тіла грибів були зібрані протягом 10-30 травня 2024 року зі стовбурів трьох старих верб у Стрийському районі Львівської області. Попередньо проводилися щотижневі спостереження за потенційними місцями зростання цих грибів та часом їх можливої появи. Приблизно через тиждень після появи плодових тіл 10 травня було проведено перший збір (молоді гриби), через 2 тижні – 17 травня з того ж місця було зібрано другу частину врожаю (зрілі гриби з незрілими спорами), а на третьому тижні 23 травня було проведено третій збір плодових тіл (зрілі гриби зі зрілими спорами). Останній збір було проведено через чотири тижні 30 травня (перезрілі гриби).

5.1.2. Приготування екстракту з *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

50 г. сировини кожної стадії зрілості двічі екстрагували 500 мл петролейного ефіру протягом години в апараті Сокслета. Отримані екстракти відтискали через марлю і давали відстоятися ніч, так як через марлю просочувалися дрібні часточки сировини, які за ніч осідали. Осад видаляли методом центрифугування і об'єднували з відтиснутим шротом кожного зразка. Більшу частину надоосаду екстрактів відганяли. Сконцентровані екстракти

після відгонки випарювали в сушильній шафі при температурі 55-65 °С. Отримали жовтувату затверділу смолоподібну субстанцію. Кожен зразок розчиняли в хлороформі і аналізували за допомогою ГХ-МС.

5.1.3. Підтвердження наявності сквалену та інших речовин

Розчини екстрактів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill та 1% розчин сквалену, як зразок для порівняння, наносили на пластини Silufol UV розміром 14 × 12 см. Як систему розчинників використовували гексан – хлороформ (1:1). Після підняття системи розчинників на висоту 11–11,5 см пластину виймали з хроматографічної камери, сушили в сушильній шафі при температурі +60 °С до вивітрювання розчинників, і поміщали в камеру з йодом. Сквален проявлявся у вигляді жовтокоричневих плям з $R_f = 0,9$, також вимірювали показник заломлення ($D = 1,499$) та йодне число (380).

Під час проведення ТШХ на пластинах Silufol UV 254 сквален рухався майже разом з фронтом розчинника (Рис. 5.2.).

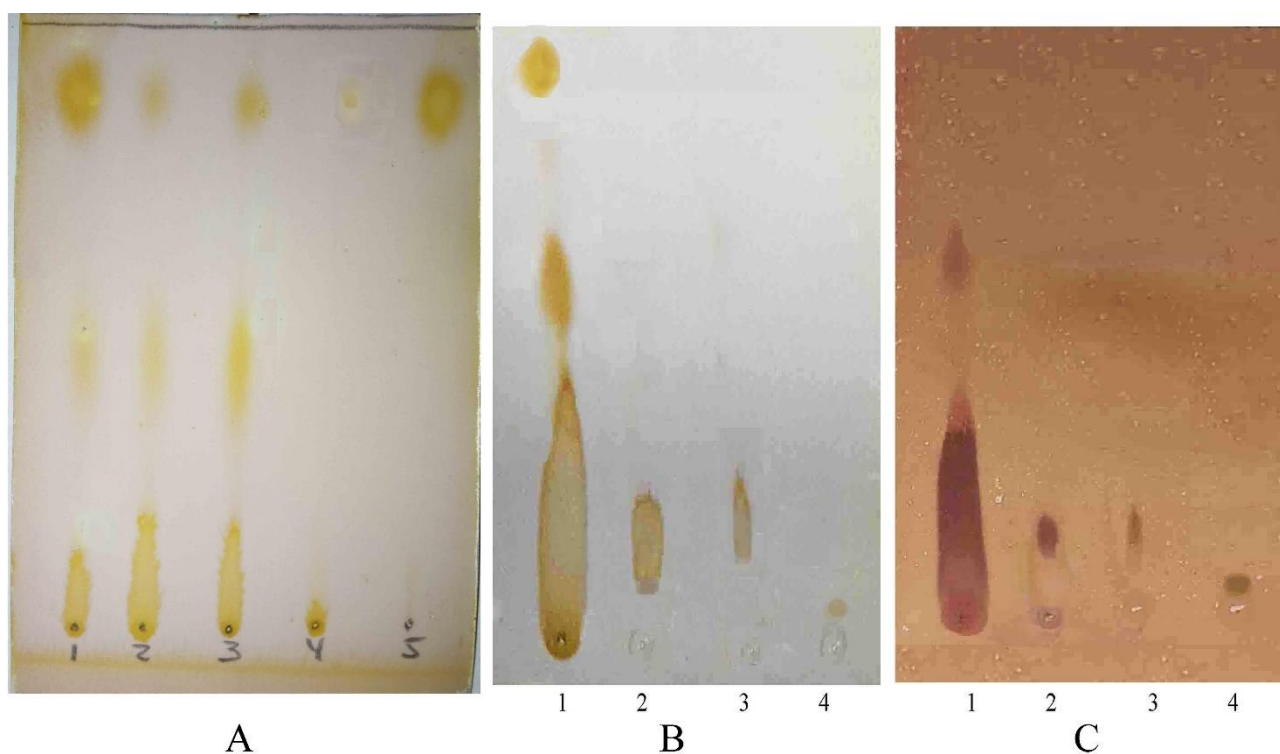


Рис. 5.2. ТШХ екстрактів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

А – ТШХ ліпофільних екстрактів з плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill на різних стадіях зрілості. (1) молоді гриби; (2) зрілі з незрілими спорами; (3) зрілі зі зрілими спорами; (4) перезрілі; (5) сквален (свідок), проявляли в парах йоду;

В – ТШХ (1) ліпофільного екстракту зі зрілих плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (2) олеїнової (3), пальмітинової (4) стеаринової кислот, проявляли в парах йоду;

С – ТШХ (1) ліпофільного екстракту зі зрілих плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (2) олеїнової (3), пальмітинової (4) стеаринової кислот, проявляли через утворення солей міді.

Як видно з хроматограми (Рис. 5.2.А), інтенсивність забарвлення, що відповідає сквалену, зменшується зі зростанням плодових тіл. Пари йоду також виявляють інші сполуки, здатні реагувати з йодом, найімовірніше, ненасичені жирні кислоти, що містяться в екстракті. На Рис. 5.2.В у нижній частині хроматограми можуть бути присутні олеїнова, пальмітинова та стеаринова кислоти. Стеаринова кислота, дуже слабо реагувала з йодом. Аналогічно, у нижній частині хроматограми (Рис. 5.2.С) ліпофільний екстракт зі зрілих плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill утворює солі міді з органічними кислотами, які можуть включати кислоти, перелічені вище. Ця реакція є найбільш специфічною, її не дасть сквален та інші ненасичені вуглеводні, які можуть реагувати з йодом.

Більш детальні результати ми отримали за допомогою ГХ-МС.

5.1.4. Результати ГХ-МС досліджень плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

Сума ліпофільних речовин, екстрагованих петролейним ефіром, має жовту воскоподібну консистенцію. Їх маса незначна та зменшується зі

старінням плодових тіл. За допомогою ГХ-МС у ньому було виявлено від 20 до 25 індивідуальних речовин (Табл. 5.1.).

Таблиця 5.1.

Вміст ліпофільного екстракту (у %) від маси сировини та кількість речовин, виявлених у плодових тілах *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, залежно від стадії зрілості

	Стадія зрілості плодових тіл			
	молоді	зрілі з незрілими спорами	зрілі зі зрілими спорами	перезрілі
Вихід ліпофільного екстракту (у %) від маси сировини	1,24 ± 0,11%	0,95 ± 0,09%	0,84 ± 0,08%	0,24 ± 0,07%
Кількість речовин, виявлених за допомогою ГХ-МС	22	22	25	20

Згідно з даними ГХ-МС, основними речовинами ліпофільного екстракту є 4 вищі жирні кислоти (Табл. 5.2.) та насичені вуглеводні, а також ненасичений вуглеводень сквален (Табл. 5.3.). Основними речовинами ліпофільних екстрактів є жирні кислоти: насичені (пальмітинова та стеаринова) та ненасичені (олеїнова та ліноленова), насичені вуглеводні докозану (C₂₂H₄₆), трикозану (C₂₃H₄₈), тетракозану (C₂₄H₅₀) та пентакозану (C₂₅H₅₂), а також ненасичений вуглеводень сквален (C₃₀H₅₀).

Таблиця 5.2.

Вміст жирних кислот (у %) від маси сировини з плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill залежно від стадії зрілості

Жирні кислоти	Час утримання	Стадія зрілості плодових тіл			
		молоді	зрілі з незрілими спорами	зрілі зі зрілими спорами	перезрілі
Пальмітинова кислота	12,672	8,26	8,95	8,19	8,77

Стеаринова кислота	13,956	4,30	4,35	4,03	4,38
Олеїнова кислота	13,849	-	23,43	30,58	42,92
Лінолева кислота	13,825	72,74	47,26	35,85	-
Сумарна кількість		85,30	83,99	78,65	56,07

Таблиця 5.3.

Вміст вуглеводнів (у %) від маси сировини з плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill залежно від стадії зрілості

Вуглеводні	Час утримання	Стадія зрілості плодових тіл			
		молоді	зрілі з незрілими спорами	зрілі зі зрілими спорами	перезрілі
Сквален	17,512	2,86	1,39	1,06	0,32
Докозан	14,134	2,49	1,75	1,09	3,63
Трикозан	14,711	1,53	1,93	1,68	5,50
Тетракозан	15,264	1,84	2,35	2,82	6,72
Пентакозан	15,799	1,21	1,47	1,93	4,85
Ейкозан	16,311	0,87	2,07	1,67	3,63
Гептакозан	16,810	0,55	0,41	1,26	2,55
Октакозан	17,298	-	-	-	1,19
Сумарна кількість		11,35	11,37	11,51	28,39

Вищі жирні кислоти та вуглеводні загалом становлять понад 90% маси ліпофільних екстрактів вегетативних плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill та дещо менше – 90% – для перезрілих плодових тіл. Решта 8-12 речовин ліпофільних екстрактів містяться в невеликих кількостях.

Якщо % вміст пальмітинової та стеаринової кислот у ліпофільному екстракті, отриманому на різних стадіях росту плодових тіл, залишається приблизно на одному рівні, то вміст ненасичених жирних кислот сильно варіюється. Водночас вміст олеїнової кислоти збільшується зі старінням плодових тіл, тоді як вміст лінолевої кислоти, навпаки, зменшується. У молодих грибах олеїнова кислота не виявлена в ліпофільному екстракті, і навпаки, лінолева кислота не виявлена в перестиглих плодових тілах *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill.

Загальний вміст вуглеводнів у вегетативних грибах залишається приблизно на одному рівні та різко зростає у плодових тілах, які припинили ріст. Цікаво, що вуглеводні *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill представлені досить вузькою групою високомолекулярних вуглеводнів від $C_{22}H_{46}$ до $C_{25}H_{52}$. Слід зазначити, що структури летиפורових кислот, які є жовтим пігментом плодових тіл гриба, в основному містять ненасичений вуглеводний ланцюг з 25-26 атомами вуглецю (Рис. 5.3.).

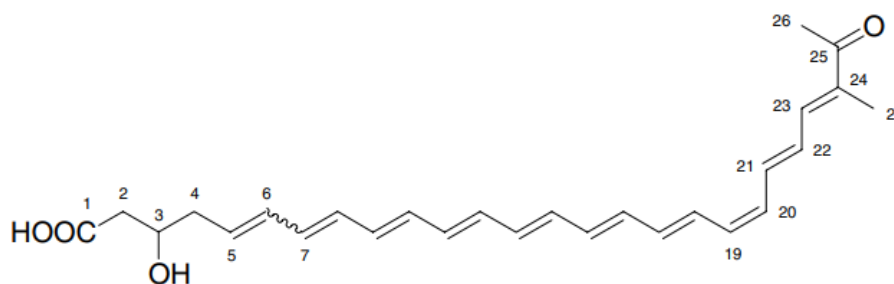


Рис.5.3. Структурна формула летиפורової кислоти

Можливо, що летиפורові кислоти синтезуються з високомолекулярних вуглеводнів, які присутні в плодових тілах грибів. У перестиглих грибах летиפורові кислоти не синтезуються, що може бути причиною накопичення в них високомолекулярних вуглеводнів.

5.2. Дослідження *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Метою роботи було вивчення змін хімічного складу плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. залежно від стадії росту грибів. Як об'єкт дослідження використовувалися плодові тіла дикорослого та культивованого *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromycel PL132. Зміни якісного та кількісного складу ліпофільної фракції досліджували за допомогою газової хромато-мас-спектрометрії.

Ліпофільні речовини, до яких належать ергокальцифероли, токофероли, сквален та вищі жирні кислоти, становлять інтерес для медицини та економіки.

Однак їх вміст, за даними різних дослідників, дуже різний. Однією з можливих причин цього є збір сировини в різні фази росту грибів. Тому ми поставили собі за мету дослідити зміни хімічного складу плодових тіл залежно від стадії росту грибів.

5.2.1. Збір сировини *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Плодові тіла *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromysel PL132 були взяті з ТОВ "Добрий Гриб" (Львівська область, село Лавриків). Гриби вирощували в слабо освітленому, прохолодному приміщенні ($t = +10-15\text{ }^{\circ}\text{C}$). Було підготовлено три порції зразків, які відрізнялися зовнішнім виглядом та часом росту на солом'яному субстраті:

- 1) молоді гриби, плодові тіла яких формувалися не більше ніж за 7 днів;
- 2) зрілі гриби, що потрапляють у торговельну мережу (7–14 днів);
- 3) перестиглі гриби, харчова цінність яких вважається зниженою (більше 14 днів росту).

Плодові тіла дикорослого *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. були зібрані в листопаді 2020 року в лісі на пеньку клена в Стрийському районі Львівської області.

5.2.2. Приготування екстракту з *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Використовували 50 г. сировини кожної стадії зрілості для культивованих грибів і 30 г. сировини для дикорослої форми. Кожен зразок двічі екстрагували петролейним ефіром у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10 протягом години в апараті Сокслета. Отримані екстракти центрифугували і фільтрували. Осад видалений методом центрифугування об'єднували з відтиснутим шротом кожного зразка. Більшу частину надосаду екстрактів відганяли. Сконцентровані екстракти після відгонки випарювали в сушильній шафі при температурі 55-65 °С. Отримали жовтувату олієподібну субстанцію.

Експеримент повторювали тричі. Кожен зразок розчиняли в хлороформі і аналізували методом ГХ-МС.

5.2.3. Результати досліджень плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Залежно від стадії росту грибів, вихід сухої речовини з плодових тіл дещо відрізнявся (Табл. 5.4.). Вміст сухої речовини у зрілих грибах дещо нижчий, ніж у молодих, а у перестиглих грибах він знову збільшується, найімовірніше, через втрату вологи. У дикорослих грибах вихід сухого залишку приблизно на 37% вищий порівняно з культурними грибами.

Таблиця 5.4.

Вихід сухих залишків плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. на різних стадіях зрілості

№	Дикорослі гриби			Культуровані гриби								
	Зрілі			Молоді			Зрілі			Перезрілі		
	Маса в г.		% сухого залишку	Маса в г.		% сухого залишку	Маса в г.		% сухого залишку	Маса в г.		% сухого залишку
	Свіжих	Висушених		Свіжих	Висушених		Свіжих	Висушених		Свіжих	Висушених	
1	220,0	21,01	9,55	700,0	52,96	7,56	700,0	48,74	6,96	700,0	64,12	9,16
2	340,0	33,56	9,87	700,0	54,66	7,81	700,0	46,78	6,68	700,0	63,49	9,07
3	170,0	17,05	10,03	700,0	55,86	7,98	700,0	51,88	7,41	700,0	63,77	9,11
4	170,0	17,10	10,06	700,0	56,14	8,02	700,0	53,26	7,60	700,0	62,72	8,96
5	150,0	15,18	10,12	700,0	55,16	7,88	700,0	51,81	7,40	700,0	63,7	9,06
			9,93± 0,38			7,85± 0,30			7,21± 0,53			9,07± 0,11

Маса ліпофільних речовин у дикорослих грибах була в п'ять разів більшою за масу аналогічних речовин у культурованих грибах. Вихід ліпофільних речовин з плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту

Euromysel PL132 незначний і має тенденцію до зниження під час росту та дозрівання грибів (Табл. 5.5.).

Таблиця 5.5.

Відсоток ліпофільного залишку на різних стадіях росту плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Стадія зрілості	Номер експерименту	Маса зразку	Маса ліпофільного залишку	%
Культивовані гриби				
Молоді	1	31,0	0,117	0,38
	2	27,2	0,087	0,32
	3	26,1	0,094	0,36
	Середнє значення 0,35			
Зрілі	1	20,5	0,034	0,17
	2	22,1	0,042	0,19
	3	21,8	0,046	0,21
	Середнє значення 0,19			
Перезрілі	1	29,9	0,041	0,14
	2	30,0	0,048	0,16
	3	27,8	0,036	0,13
	Середнє значення 0,14			
Дикорослі гриби				
Зрілі	1	12,0	0,074	0,62
	2	10,0	0,128	1,28
	3	14,3	0,147	1,03
	Середнє значення 0,98			

Хімічний склад ліпофільного залишку грибів на різних стадіях росту суттєво відрізнявся як якісно, так і кількісно. У молодих грибів у ліпофільному залишку за допомогою ГХ-МС було виявлено лише шість речовин (Табл. 5.6.). Найбільший за вмістом (34,19%) був біс(2-етилгексил)фталат, а стимулятор росту гіберелін А₃ становив 28,11%. Вміст сквалену становив 8,42%. Вищі жирні кислоти та ергокальциферол у цьому залишку не були виявлені.

Таблиця 5.6.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції молодих плодових тіл
Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromycel PL132.

№	Час утримання	Субстанція	%
1	12.600	Бутиральдегід	7.53
2	13.718	9-децен-1-ол	18.47
3	16.103	Біс(2-етилгексил)фталат	34.19
4	16.798	2-бутеніл-2-пропеніловий ефір	3.28
5	17.494	Сквален	8.42
6	20.423	Гіберелін А ₃	28.11

Ліпофільний залишок, отриманий зі зрілих товарних грибів, містив значно ширший спектр речовин. Загалом, за даними ГХ-МС, їх було виявлено 45, хоча вміст 30 з них був меншим за 1%. У цьому залишку було виявлено значно менше гібереліну А₃ (1,11%), тоді як вміст біс(2-етилгексил)фталату був майже в 2,5 рази нижчим, а сквалену – приблизно в чотири рази (Табл. 5.7.). У ліпофільному залишку, отриманому зі зрілих грибів, було ідентифіковано кілька вищих жирних кислот (пальмітинову, стеаринову та ліноленову), загальний вміст яких досягав 12,54%, а також двоосновну себацинову кислоту. У залишку також були виявлені вуглеводні (гептадекан, тетратріаконтан) та їх похідні.

Таблиця 5.7.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції зрілих плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromycel PL132.

№	Час утримання	Субстанція	%
7	9.211	Гептадекан	1.07
8	9.366	Фенол	1.44
16	12.606	Пальмітинова кислота	4.98
17	12.707	Дибутилфталат	1.73
18	12.850	Циклогексанол	2.56
20	13.724	Лінолева кислота	5.44
21	13.748	2-метилциклогексанон	4.87

22	3.873	Стеаринова кислота	2.12
26	15.246	Тетратріаконтан	1.54
31	16.102	Біс(2-етилгексил)фталат	13.69
34	16.911	Себацінова кислота	1.42
36	17.500	Сквален	2.09
37	17.809	Гіберелін A ₃	1.11

Зі старінням плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. спектр ліпофільної фракції скоротився до 21 речовини, очевидно, через зниження метаболічних процесів. Вміст сквалену зменшився приблизно на 15%, а вміст біс(2-етилгексил)фталату – більш ніж у два рази порівняно зі зрілими грибами. Водночас збільшилася кількість вищих жирних кислот, а їх загальна кількість у ліпофільному залишку перевищила 60% (Табл. 5.8.). У ліпофільному залишку перезрілих грибів з'явився ергоста-5,7,22-трієн-3-ол, вміст якого сягає 18% від маси ліпофільного залишку.

Таблиця 5.8.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції перезрілих плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. сорту Euromycel PL132.

№	Час утримання	Субстанція	%
9	12.618	Пальмітинова кислота	15.37
10	12.708	Бутил-(2-етилгексил)фталат	1.71
11	13.742	Лінолева кислота	41.00
12	13.879	Пальмітинова кислота	4.51
14	16.103	Біс(2-етилгексил)фталат	5.84
17	17.500	Сквален	1.78
19	20.414	Ергоста-5,7,22-трієн-3-ол	18.00

Аналіз ліпофільної фракції дикорослих плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. виявив 18 речовин, основні з яких представлені в Табл. 5.9.. Примітно, що дикорослі гриби демонструють дуже високий вміст лінолевої кислоти, що становить 57,14% від загального ліпофільного залишку, поряд зі значно вищим вмістом сквалену, наявністю токоферолу ацетату (вітаміну Е) та

ширшим спектром ергостеролів. Загальний вміст ергостеролу (13,83%) можна порівняти з тим, що міститься в перестиглих культивованих грибах.

Таблиця 5.9.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції дикорослих плодових тіл
Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm..

№	Час утримання	Субстанція	%
2	12.054	Пентадеканова кислота	1,35
3	12.707	Дибутилфталат	0,89
4	12.606	Пальмітинова кислота	5,69
5	13.724	Лінолева кислота	57,14
7	16.102	Біс(2-етилгексил)фталат	3,42
8	17.500	Сквален	7,73
9	19.206	α-токоферолу ацетат	1,53
10	19.241	3,5-холеста-6,8(14)-дієн	0,90
13	20.188	22Е-ергоста-5,7,9,22-тетраєн-3β-ол	0,73
15	20.414	Ергоста-5,7,22-трієн-3-ол	9,19
16	20.485	Ергоста-5,22-дієн-3-ол	1,03
18	20.830	γ-ергостенол	1,13

Найбільш суперечливим питанням є наявність похідних фталевої кислоти в ліпофільних екстрактах досліджуваних зразків. Нещодавно було опубліковано низку оглядових статей про розподіл фталатів у нижчих та вищих рослинах, бактеріях та грибах. Фталати були виявлені у дуже великій кількості вищих рослин, водоростей та грибів [115-117]. Ці автори показують, що в більшості випадків фталати мають антропогенне походження (з добрив, агрохімікатів, забрудненої води та повітря). З іншого боку, фталати, які не виробляються промислово, були виявлені в низці природних об'єктів. Крім того, експерименти на червоній водорості *Bangia atropurpurea* показали, що C_{14} з $NaH_{14}CO_3$ перетворюється на дибутилфталат та діетилфталат [118].

Фталати почали знаходити в невеликих кількостях у справжніх грибах з розвитком сучасних чутливих методів аналізу, зокрема, ГХ-МС. Так, у 1976 році була опублікована робота, в якій фталати були описані як компоненти

специфічного запаху дикорослих їстівних грибів Фінляндії. Зокрема, діетилфталат та дибутилфталат були виявлені у *Cantharellus cibarius* Fr. та *Gyromitra esculenta*, а дибутилфталат – у *Agaricus bisporus* [119]. На той час виробництво фталатів у Північній Європі ще не було розвинене, і мало ймовірно, що фталати в цих грибах могли бути результатом забруднення. На нашу думку, фталати, як вторинні метаболіти, можуть відігравати важливу захисну роль у певних групах грибів. При аналізі молочного соку грибів роду *Lactarius* фталати були виявлені у всіх проаналізованих грибах [120,121]. Молочний сік грибів роду *Lactarius*, можна розглядати як стабільну збалансовану емульсію, що містить велику кількість речовин, одна частина яких відповідає за токсичну дію на інші живі організми, а інша визначає стабільність цієї емульсії. Це створює ефективну систему захисту грибів роду *Lactarius* від мікроорганізмів, комах, молюсків та тварин. Фталати, зокрема, можуть бути відповідальними за інсектицидний ефект [121].

Результати стосуються грибів, вирощених у прохолодному ($t = +10-15$ °C), слабо освітленому приміщенні. Водночас, у літературі є дані, які свідчать про те, що на кількість певних речовин у плодових тілах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. впливають різні фактори: склад субстрату [42,106], вологість субстрату [122], температура повітря, рівень освітленості [123,124], концентрація солей у субстраті [125], рН субстрату [126], кількість та склад мінеральних [127] та органічних [128] добрив. Зокрема, було зазначено, що найкращим значенням рН для росту грибів є 6,0 та температура $+30$ °C [126].

Світло – це сигнал, який вказує на те, що міцелій досяг поверхні, коли спори можуть утворюватися в середовищі, придатному для їх вивільнення у зовнішній світ [122]. Короткі довжини хвиль (синє світло) стимулюють ріст плодових тіл, а довші довжини хвиль неефективні. Кількість світла, необхідна для росту плодових тіл, незначна; вона нижча за кількість повного місячного світла при ясному небі [124]. Наприклад, навіть короткочасне (протягом години) ультрафіолетове світло суттєво змінює кількість ергостеролів [129] та

жирних кислот у плодових тілах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. [123]. Водночас, дослідження впливу зеленого світла (515-530 нм) на ріст міцелію п'яти видів *Pleurotus* (*Pleurotus citrinopileatus* Singer, *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, *Pleurotus eryngii* (DC.) Quéf., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. та *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéf.) показало, що воно знижує ріст біомаси міцелію цих грибів, але збільшує їх целюлолітичну та ксиланолітичну активність. Целюлолітична активність більшості досліджуваних штамів збільшувалася у присутності зеленого світла, зі збільшенням від 1,5 раза (ендоглюканаза *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) до 8 разів (загальна целюлаза та ендоглюканаза *Pleurotus citrinopileatus* Singer). Зелене світло знижувало лакказну активність для більшості досліджуваних штамів. Питома ферментативна активність целюлази та ендоглюканази *Pleurotus citrinopileatus* Singer збільшувалася у 31 раз та 30 разів відповідно порівняно з темрявою. Крім того, під впливом зеленого світла питома лакказна та ксиланазна активність *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéf. збільшилася у 4,4 рази та 6,8 рази відповідно [130].

Вміст вологи в субстраті є важливим фактором росту та метаболічної активності грибів [124,131], Оптимальний вміст вологи в субстраті для росту гриба *Pleurotus* становить від 50% до 80% Вологість субстрату важлива для активності грибкових ферментів та швидкості деградації зв'язків у лігніні в клітинних стінках деревини. Цей лігнін розщеплюється ферментами, що виробляються *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. [107,132].

Хоча ми не вивчали всі ці впливи на хімічний склад грибів, усі дослідження проводилися на культивованих грибах, вирощених за однакових умов температури, вологості та освітлення. Тому ми можемо бути впевнені, що динаміка цих змін буде такою ж для інших експериментальних умов. Дикорослі гриби росли за різних температурних умов, на різних субстратах та за наявності сонячного світла. Це може бути причиною більшої кількості ліпофільних речовин та відмінностей у хімічному складі.

5.3. Дослідження *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui

Fomitopsis betulina (Bull.) В.К. Cui (*Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporales, Fomitopsidaceae*) є поширеним паразитом різних видів берези в Європі, Північній Америці та Азії. Викликає буру гниль деревини старих і ослаблених дерев. Молоді плодові тіла цього виду можуть бути вжиті у їжу, однак смакові якості їх низькі, смак гриба м'який або злегка гіркувато-кислий і тому його вживають лише з лікувальною метою. Згідно літературних даних у плодових тілах грибів виявлено великий асортимент ліпофільних та водорозчинних речовин. Серед них тритерпенові сполуки ланостанового ряду у яких виявлена протимікробна активність по відношенню до грам-позитивних бактерій. У клітинній стінці плодових тіл є різноманітні полісахариди (ПС), зокрема D-глюкани у різних аномерних конфігураціях (α -, β - та змішані α , β), 171 що містять 1,3-; 1,4-; 1,6-зв'язки. Вони відрізняються ступенем розгалуження, молекулярною масою та розчинністю, що впливає на їх біологічну активність. Особливий інтерес представляють α -та β -1,3- D-глюкани, яким приписують різноманітні біологічні властивості. Зокрема, у них виявлена протизапальна та ранозагоюча, імуностимулююча і протипухлинна дія. Для одержання біологічно активних речовин більшість дослідників використовували плодові тіла без вказання стадії їх розвитку або використовували суміш плодових тіл різного ступеня зрілості, що веде до дуже великої розбіжності одержаних результатів.

5.3.1. Збір сировини *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui

Молоді, зрілі і перезрілі плодові тіла грибів збирали із стовбурів мертвих берез із одного місця з інтервалом 7 днів. Поряд з тим поділ на молоді, зрілі і перезрілі плодові тіла додатково здійснювали оцінкою їх морфологічного стану. Молода березова губка (*Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui) була білою, м'якою на дотик та легко розділялася на частини. Стигли плодові тіла були

сіруватого кольору і потрібно було розрізати за допомогою нажа. Перестиглі плодові тіла були буроватого кольору, частково здерев'янілі і їх було досить складно розрізати.

5.3.2. Приготування екстракту з *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui

Використовували 50 г. сировини кожної стадії зрілості. Кожен зразок двічі екстрагували петролейним ефіром у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10 протягом години в апараті Сокслета. Отримані екстракти центрифугували і фільтрували. Осад видалений методом центрифугування об'єднували з відтиснутим шротом кожного зразка. Більшу частину надосаду екстрактів відганяли. Сконцентровані екстракти після відгонки випарювали в сушильній шафі при температурі 55-65 °С. Експеримент повторювали тричі. Кожен зразок розчиняли в хлороформі і аналізували методом ГХ-МС.

Екстракцію полісахаридів зі шроту, що залишився після екстракції петролейним ефіром, здійснювали дистильованою водою у співвідношенні 1:10. При цьому були використані два режими екстракції: нагрівання суміші від кімнатної температури до її кипіння протягом 15 хвилин і перемішування подрібненої сировини з окропом на гарячій (90 – 95 °С) водяній бані. Екстракт відтискали на пресі через щільну тканину і шрот повторно екстрагували гарячою водою. Одержані екстракти об'єднували, центрифугували 10 хв при 5000 g, надосадову рідину фільтрували. Полісахариди осаджували одним об'ємом етанолу. Подальше додавання етанолу не давало осаду. Осад тричі промивали етанолом, далі ацетоном і діетиловим етером і висушували в сушильній шафі при +56 °С.

5.3.3. Результати досліджень плодових тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui

Вихід сухих ліпофільних екстрактів в молодих і зрілих зразках мало відрізнявся, тоді як в перезрілій стадії зменшився більше ніж в два рази. Також

спостерігалось зменшення сумарної кількості речовин, які були виявлені ГХ-МС, в процесі росту плодових тіл. (Табл. 5.10.)

Таблиця 5.10.

Вихід ліпофільних екстрактів і кількість виявлених речовин в процесі досліджень *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui

	молоді	зрілі	перезрілі
Вихід ліпофільного екстракту (у %) від маси сировини	0,2 ± 0,06%	0,18 ± 0,09%	0,09 ± 0,12%
Кількість речовин, виявлених за допомогою ГХ-МС	22	18	19

У молодій *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui переважала олеїнова кислота, при досить низькій кількості сквалену в порівнянні з *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Табл. 5.11.)

Таблиця 5.11.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції молодих плодових тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui

№	Назва речовини	Час утримання	% вміст	Ступінь достовірності
5	Пальмітинова кислота	12,648	7,68	99
7	Олеїнова кислота	13,843	72,02	99
8	Стеаринова кислота	13,926	3,07	98
15	Тетракозан	15,264	1,68	98
16	Пентакозан	15,799	1,06	98
21	Сквален	17,512	1,16	98

В зрілій формі зменшується вміст олеїнової кислоти і збільшується кількість лінолевої і пальмітинової кислот. З'являється характерний для грибів

ергостерин (Ергоста-5,7,22-трієн-3-ол). Кількість сквалену очікувано зменшується. (Табл. 5.12.)

Таблиця 5.12.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції зрілих плодів тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй

№	Назва речовини	Час утримання	% вміст	Ступінь достовірності
5	Пальмітинова кислота	12,654	10,15	99
7	Лінолева кислота	13,807	33,49	99
8	Олеїнова кислота	13,837	33,97	99
9	Стеаринова кислота	13,926	3,12	98
11	Метилфумарат	15,008	2,46	22
12	4-етил-2,5-диметилтіазол	15,193	1,54	25
13	Тетракозан	15,258	1,49	94
16	Сквален	17,512	0,83	96
18	Ергоста-5,7,22-трієн-3-ол	20,663	6,48	97

В перезрілої *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй в основному змінюється співвідношення кислот і ергостерин замінюється на один з метаболітів – естра-1,3,5(10)-трієн-17-ол. Кількість сквалену навіть дещо збільшилася до показників молоді *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй. (Табл. 5.13.)

Таблиця 5.13.

Якісний та кількісний склад ліпофільної фракції перезрілих плодів тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй

№	Назва речовини	Час утримання	% вміст	Ступінь достовірності
1	Диметлфталат	8,932	1,48	95
5	Пальмітинова кислота	12,648	10,75	99
6	Лінолева кислота	13,784	17,73	99
7	Олеїнова кислота	13,801	25,23	99
8	Стеаринова кислота	13,914	5,15	95

9	Докозан	14,128	1,29	98
10	Ейкозан	14,705	1,64	97
11	Тетракозан	15,264	1,90	99
12	Ейкозан	15,799	1,57	97
14	Ейкозан	16,317	1,03	97
16	Сквален	17,512	1,20	95
18	4-ацетокси-1-феніл-2-додецен-1-он	21,561	7,92	38
19	Естра-1,3,5(10)-трієн-17-ол	23,933	16,12	35

Березова губка (*Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui.) на відміну від *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill і *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. демонструє значно меншу кількість сквалену в молодій формі. Всього лиш 1,16% проти 2,86% в летіпоруса, 8,42% в молодій культивованій гливи (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) і 7,73% в зрілої дикорослої форми *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (з чого можна припустити, що в молодій дикорослої форми гливи вміст сквалену може бути ще більшим). Тому як потенційне джерело сквалену *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui. менш актуальна ніж *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Більш цікавими виявилися результати водної екстракції *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui. Екстракція сировини дистильованою водою шляхом поступового нагрівання від 20°C до закипання суміші приводила до значного потемніння екстракту. Полісахариди, які з нього були осаджені етанолом, мали темний колір і не відмивалися від пігменту навіть після багатократного промивання осаду етанолом. Значно кращий результат було одержано при екстракції вичавок *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui киплячою водою, коли до киплячої води при перемішуванні добавляли подрібнені плодові тіла грибів. Тому цей метод було використано для екстракції.

Осад полісахаридів від осадження етанолом у цьому випадку залишався значно світлішим. Темний колір розчинів водорозчинних полісахаридів та суттєве поглинання при 280 нм вказує, що такою домішкою можуть бути фенольні речовини, найімовірніше, меланін. Подібний вплив киплячої води на

чистоту полісахаридів найвірогідніше пояснюється денатурацією фермента тирозинази, присутність якого у розчинах веде до утворення меланіну і ковалентного приєднання його до білково-полісахаридних комплексів. Це зменшує розчинність останніх у воді і обумовлює їх темний колір. Після їх утворення полісахариди практично неможливо очистити від пігменту. Мабуть, короткого періоду нагрівання від кімнатної температури до 70-90 °С достатньо для дії фермента. При повторному розчиненні у гарячій воді лише приблизно третя частина початкового продукту дала водорозчинний полісахарид. Можливою причиною цього є денатурація білкової частини молекулярного комплексу, одержаного за екстракції гарячою водою. Реакція на крохмаль з йодом для всіх одержаних полісахаридів була негативною, що є типовим для грибних полісахаридів. Лише дуже незначна частина водорозчинних полісахаридів осаджувалась реактивом Фелінга, який осаджує манозовмісні полісахариди.

Кислотний гідроліз водорозчинних полісахаридів *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй виявив у гідролізаті значний відсоток D-глюкози. полісахариди, одержані з молодих, зрілих і перезрілих плодових тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй візуально сильно відрізнялись. Полісахариди, одержані з молодих плодових тіл представляли собою світло-сіру пластинчасту масу, що важко порошокується. Полісахариди з перезрілих плодових тіл – це темно-коричнева маса, що розсипається при дотику і легко порошокується. Процентний вміст водорозчинних полісахаридів знижувався від молодих до перезрілих плодових тіл від $1,11 \pm 0,7\%$ до $0,43\% \pm 0,08\%$. Середня молекулярна маса полісахаридів, визначена віскозиметрично, одержаних з молодих плодових тіл становила $1500 \text{ кДа} \pm 7,4\%$, зрілих $520 \text{ кДа} \pm 3,5\%$, а у перезрілих $120 \text{ кДа} \pm 2,5\%$. Розгляд ІЧ спектрів цих полісахаридів дозволяє припустити, що можливою причиною змін є утворення комплексів полісахаридів з білками та фенольними сполуками (наімовірніше, меланіном). У молодих плодових тіл із водорозчинними полісахаридами зв'язана значна кількість білка, а у старіючих полісахариди

зв'язані з фенолами, причому, ковалентним зв'язком. Основну масу плодових тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй складають екстраговані лугом геміцелюлози, причому їх вміст у міру їх старіння збільшується \approx у 2,5 рази і складає у перезрілих плодових тілах понад 70% їх маси.

Висновки до розділу 5.

Встановлено, що протягом вегетаційного періоду плодових тіл грибів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (3-4 тижні) маса та хімічний склад ліпофільного екстракту значно змінюються. Основними речовинами ліпофільних екстрактів є жирні кислоти: насичені (пальмітинова та стеаринова) та ненасичені (олеїнова та ліноленова), насичені вуглеводні докозану, трикозану, тетракозану та пентакозану, а також ненасичений вуглеводень сквален. Відсотковий вміст пальмітинової та стеаринової кислот у ліпофільному екстракті, отриманому на різних стадіях росту плодових тіл, залишається приблизно на одному рівні. Вміст олеїнової кислоти збільшується з віком плодових тіл, тоді як вміст лінолевої кислоти, навпаки, зменшується. Вміст сквалену найвищий у молодих грибах і зменшується з віком. Було зроблено висновок, що при аналізі хімічного складу плодових тіл грибів дуже важливо вказувати стадію їх розвитку.

Якісний та кількісний хімічний склад ліпофільних екстрактів молодих, зрілих та перестиглих плодових тіл *P. ostreatus* суттєво відрізняється. У міру росту грибів спектр хімічних речовин збільшується, а потім зі старінням зменшується. З віком кількість жирних кислот та стероїдів збільшується, а кількість сквалену та фітогормонів зменшується. Примітно, що вихід ліпофільного екстракту з лісових грибів у п'ять разів вищий, ніж з культивованих. У цьому екстракті було виявлено вітамін Е, більше ергостеролів, сквалену та ліноленової кислоти. Можливою причиною цього є ріст лісових грибів на сонячному світлі, інших температурах та вологості.

Спостерігалось поступове зменшення кількості сквалену та біс(2-етилгексил)фталату у ліпофільних екстрактах від молодих до перестиглих грибів. Молоді гриби мають високий вміст фітогормону гібереліну А₃, який відсутній у зрілих та перестиглих грибах. Водночас перестиглі гриби мають 18% ергоста-5,7,22-трієн-3-олу, попередником якого є сквален. У молодих грибах жирних кислот не виявлено. Вони зустрічаються у зрілих грибах, і їх вміст, зокрема пальмітинової, стеаринової та ліноленої кислот, збільшується від зрілих до перезрілих плодових тіл грибів. Водночас вихід ліпофільного екстракту з дикорослих грибів у п'ять разів вищий, ніж з культивованих (0,98% проти 0,14–0,35%). Цей екстракт характеризується наявністю вітаміну Е та високим вмістом сквалену, ліноленої кислоти та ергостеролів. Було визначено, що спектр хімічних речовин збільшується зі зростанням грибів і зменшується з їх старінням.

Плодові тіла *Fomitopsis betulina* (Bull.) V.K. Cui ростуть на відмерлих або ослаблених стовбурах видів берези протягом нетривалого часу (близько 30 днів) і за цей час у їх хімічному складі відбуваються дуже суттєві зміни у якісному та кількісному складі. Водорозчинні полісахариди слід одержувати з молодих плодових тіл, поки гіменофор не має темного кольору, при пізніших термінах збору полісахариди практично неможливо очистити від ковалентно зв'язаних фенолів.

Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [133-135].

РОЗДІЛ 6

ДОСЛІДЖЕННЯ КІЛЬКІСНИХ ТА ЯКІСНИХ ЗМІН ХІТИНУ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ДОЗРІВАННЯ ПЛОДОВИХ ТІЛ ГРИБІВ

6.1. Мета дослідження

Після серії екстракцій різними розчинниками, шрот що залишився, може бути використаний для отримання хітину. Тож ми досліджували екстракцію хітину різними розчинниками та зміни кількості хітину та його молекулярної маси на різних стадіях зрілості у плодових тілах грибів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Oudemansiella mucida*, *Lycoperdon perlatum* Pers. та *Fomitopsis betulina* (Bull.) V.K. Cui в рамках комплексного дослідження біологічно-активних речовин сировинних джерел сквалену.

Хітин, полімер бета-1,4-N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc), є основним компонентом екзоскелетів членистоногих. Він також є важливим компонентом клітинної стінки грибів: він забезпечує жорсткість і форму клітинних стінок. Хітин є характерним компонентом грибів класів *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, and *Deuteromycetes*, але він не зустрічається в *Oomycetes* [136,137]. Згідно з літературними даними, вміст хітину в плодових тілах різних видів грибів неоднаковий.

Існують значні труднощі з очищенням хітину від сировини, тому в більшості досліджень дослідники визначають вміст хітину непрямим методом. Хітинвмісний матеріал гідролізують 6 н. соляною кислотою (HCl) при 106 °C протягом 24 годин. Після нейтралізації вміст N-ацетил-D-глюкозаміну визначається в гідролізаті, який використовується для розрахунку вмісту хітину [138,139]. Недоліком цього підходу є можливість віднесення моно- та олігосахаридів N-ацетил-D-глюкозаміну в грибному матеріалі до хітину, що призводить до переоцінки. Крім того, цей метод не може оцінити зміни молекулярної маси, які можуть відбуватися під час дозрівання плодових тіл.

Екстракція хітину з грибного матеріалу стикається зі значними труднощами, оскільки хітин розчинний лише в обмеженому діапазоні розчинників, які також сприяють гідролізу хітину. Ці розчинники включають сильні мінеральні кислоти, деякі солі та так звані іонні рідини [140,141]. Більшість з них є агресивними або малодоступними.

6.2. Збір сировини

Плодові тіла грибів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Lycoperdon perlatum* Pers. та *Fomitopsis betulina* (Bull.) V.K. Cui були зібрані на околиці міста Львів переважно в літньо-осінній період. Відразу після збору їх сушили до постійної ваги в сушильній шафі при температурі 55 °С.

Щоденні спостереження проводилися в місцях, де росли ці гриби. Приблизно через 1 тиждень після появи плодових тіл їх збирали (молоді гриби). На 2 тижні, з того ж місця збирали зрілі гриби. Плодові тіла перестиглих грибів збирали на 3-му тижні. При цьому плодові тіла розділяли на молоді, зрілі та перестиглі, враховуючи час їх збору та оцінюючи їх морфологічний стан.

Хітин з панцирів креветок був придбаний у Sigma Aldrich Co (Сент-Луїс, США)(партія № SLBL9061V).

6.3. Вибір розчинника для розчинення хітину креветок

Спочатку ми дослідили розчинність комерційно доступного хітину креветок у різних розчинниках. Цей хітин має високу молекулярну масу (80–920 кДа) [142-144] та високий ступінь ацетилювання (82%–98%) [142,143], тому потребує суворих умов для розчинення. Як повідомляється в літературі, хітин, отриманий з грибів, повинен мати нижчу молекулярну масу [141,145]. Отже, він повинен бути більш розчинним, ніж хітин креветок. Слідуючи цій логіці, розчинник, який розчиняє хітин креветок, також розчинятиме хітин грибів. Ми виявили, що лише HCl у концентрації вище 25%, 85% ортофосфорна

кислота (H_3PO_4) та насичений розчин бромиду берилію (BeBr_2) повністю розчиняли хітин креветок. На відміну від результатів, отриманих іншими дослідниками [145,146], нам не вдалося розчинити хітин креветок від Sigma в суміші 8% NaOH і 4% сечовини. Тому ми не використовували цей розчинник. Через високу в'язкість розчинів H_3PO_4 та BeBr_2 було б дуже важко змішувати ці речовини із сировиною, що значно збільшило б час екстракції. Тому ми вирішили використовувати 25% HCl для екстракції хітину з плодових тіл грибів.

6.4. Розчинення хітину креветок

30–33 мг тонко подрібненого хітину креветок помістили в конічну центрифужну пробірку об'ємом 10 мл. Додали 3,0 мл розчинника та суміш постійно перемішували протягом 2 годин при 15 °C. Після цього розчин центрифугували та відзначали відсутність або наявність осаду та об'єм нерозчиненого хітину.

6.5. Екстракція та первинне очищення хітину з грибної сировини

Точну вагу висушених, подрібнених та просіяних (через сито діаметром 1 мм) плодових тіл поміщали в колбу з притертою скляною пробкою. Потім додавали 25% HCl, охолоджену до 0 °C, у співвідношенні 1:10. Суміш поміщали в холодильник при температурі 0–2 °C на 14 годин та періодично перемішували. Після екстракції суміш центрифугували протягом 10 хвилин при 6000 g, супернатант фільтрували, додавали шматочок льоду та обережно підлужували 1 М гідроксидом натрію (NaOH) до рН 6,0–7,0. Осад хітину збирали центрифугуванням, після чого промивали дистильованою водою до нейтрального рН. Його повторно розчиняли в мінімальному об'ємі 25% HCl, охолодженої до –20 °C. Нерозчинений залишок видаляли центрифугуванням, супернатант фільтрували, додавали шматочок льоду та розчин обережно підлужували 1 М NaOH до рН 6,0–7,0. Отриманий осад хітину збирали

центрифугуванням; промивали дистильованою водою до нейтральної реакції; промивали етанолом, ацетоном та діетиловим ефіром; та сушили в печі при 50 °С. Висушений залишок хітину зважували на аналітичних вагах.

6.6. Визначення молекулярної маси

Ми визначили молекулярну масу розчину хітину креветок, віскози метричним методом в 25% HCl, за температури 0–4 °С. Середня молекулярна маса становила 120 ± 20 кДа. Це свідчить про зменшення молекулярної маси щонайменше в 3–5 разів. Тому наведені в Табл. 6.1. та Рис.6.1. дані щодо екстракції хітину з плодових тіл грибів занижені. Однак, оскільки ці експериментальні дані ми отримали за однакових експериментальних умов, вважаємо, що можна судити про динаміку змін кількості хітину в плодових тілах.

Таблиця 6.1.

Молекулярна маса та вміст хітину в плодових тілах грибів на різних стадіях зрілості

№	Вид	Стадія росту	% вміст хітину від маси висушеної сировини	Молекулярна маса хітину (кДа)
1	<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	молоді	0,65	$6 \pm 1,0$
		зрілі	1,41	$11 \pm 1,0$
		перезрілі	0,47	$15 \pm 1,2$
2	<i>Fomitopsis betulina</i> (Bull.) B.K. Cui	молоді	1,37	$16 \pm 1,2$
		зрілі	2,38	$18 \pm 1,2$
		перезрілі	0,50	$19 \pm 1,2$
3	<i>Tyromyces chioneus</i> (Fr.) P. Karst.	молоді	0,25	$17 \pm 1,2$
		зрілі	0,28	$18 \pm 1,2$
		перезрілі	0,16	$19 \pm 1,2$
4	<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	молоді	3,21	$19 \pm 1,2$
		зрілі	3,80	$24 \pm 1,2$
		перезрілі	2,12	$24 \pm 1,2$
5	<i>Mucidula mucida</i> (Schrad.) Pat.	молоді	1,33	$19 \pm 1,2$
		зрілі	1,48	$20 \pm 1,2$
		перезрілі	1,26	$21 \pm 1,2$

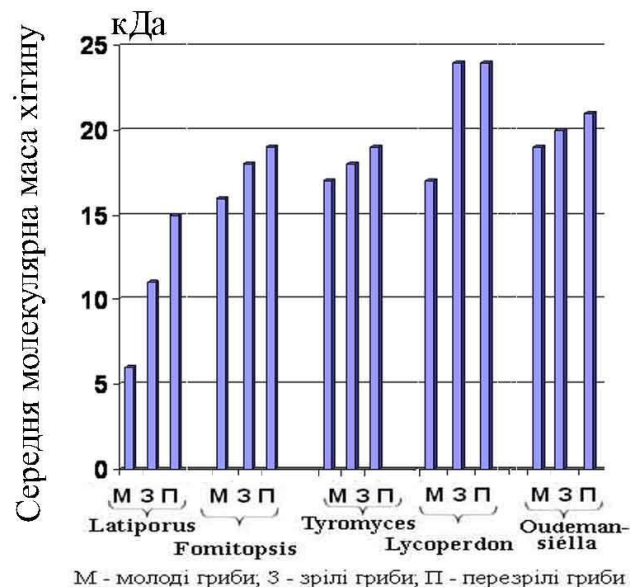
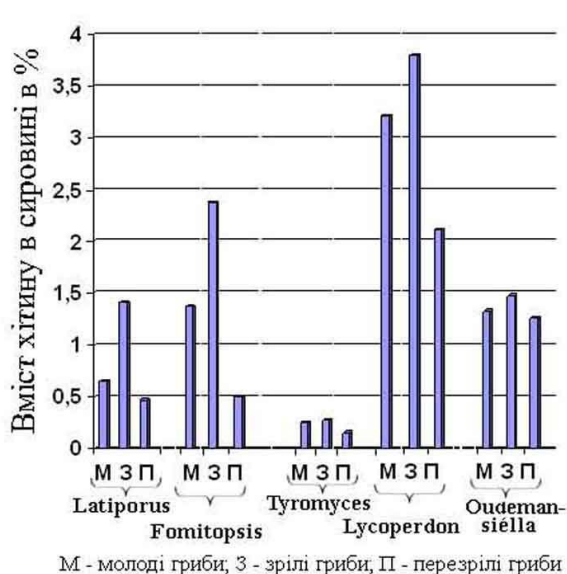


Рис. 6.1. Процентний вміст хітину в плодових тілах грибів та їх молекулярна маса.

У всіх випадках спостерігалось збільшення кількості хітину від молодих до зрілих грибів. Після дозрівання та припинення росту плодових тіл спостерігалось зменшення кількості хітину. Виходячи з наших даних, динаміка цих змін неоднакова для кожного виду грибів. Це явище можна пояснити дещо різними умовами під час їх збору (ми збирали сировину в різний час, коли погодні умови відрізнялися). Згідно з літературними даними, на біосинтез хітину найбільше впливають умови культивування та стан ферментної системи виду грибів [147].

Ми виявили, що молекулярна маса грибного хітину має тенденцію до збільшення зі старінням плодових тіл. Однак хітин, отриманий шляхом екстракції HCl, мав значно нижчу молекулярну масу, ніж хітозан, отриманий з того ж матеріалу. У попередньому дослідженні ми отримали хітозан з плодових тіл *Lactarius pergamenus*, *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. та *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. шляхом лужного гідролізу хітинвмісного матеріалу. Їхня

молекулярна маса становила 36–97 кДа [46]. Можливо, що під час екстракції концентрованою HCl, навіть при температурі, близькій до нуля, відбувається значний гідроліз хітину. Проводячи паралель з визначенням молекулярної маси хітину креветок та отриманого з нього хітозану, молекулярна маса грибною хітину, наведена в Табл. 6.1., повинна бути щонайменше в 3–5 разів більшою.

6.7. Інфрачервона спектроскопія

Інфрачервоні спектри з перетворенням Фур'є (FT-IR) зразків реєстрували на спектрометрі Spectrum Two (PerkinElmer, США) з використанням універсального алмазного аксесуара для одноразового відбиття з ослабленим повним відбиттям. Для побудови спектрів було використано програмне забезпечення PerkinElmer Spectrum. Спектри (16 сканувань на спектр) розчинів були зібрані від 4000 до 400 см⁻¹ зі спектральною роздільною здатністю 4 см⁻¹.

ІЧ-спектри хітину, екстрагованого з плодів грибів на різних стадіях зрілості, представлені в додатку Д. Дані по інфрачервоній спектроскопії представлені в Табл. 6.2.

Таблиця 6.2.

Дані інфрачервоної спектроскопії (FTIR) для хітину виділеного з плодів грибів досліджуваних грибів

Функціональна група	Хітин креветок	<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Fomitopsis betulina</i>	<i>Tyromyces chioneus</i>	<i>Lycoperdon perlatum</i>	<i>Mucidula mucida</i>
–OH	3434	3418 – 3434	3421 – 3434	3420	3424 – 3434	3418 – 3423
–NH ₂	3256	3260 – 3263	3261 – 3263	3264 – 3273	3262 – 3263	3263 – 3265
	3100	3095 – 3100	3100	3100	3100	3100
C–H	2933 – 2959	2918 – 2961	2917 – 2919	2914 – 2951	2925 – 2963	2922 – 2924
	2876 – 2890	2849 – 2891	2849 – 2877	2849 – 2873	2873 – 2876	2855 – 2875

Амід I	1654	1650 – 1653	1655	1637 – 1650	1650 – 1653	1653 – 1655
	1619	1618 – 1622	1619 – 1621	1617 – 1621	1619 – 1622	1621
Амід II	1552	1545 – 1553	1554 – 1555	1535 – 1549	1550 – 1553	1555 – 1556
–СН	1413 – 1428	1410 – 1435	1407 – 1413	1446 – 1454	1413 – 1415	1423
	1375	1375 – 1376	1376 – 1379	1372 – 1375	1375	1376
Амід III	1307	1308 – 1313	1314 – 1315	1308 – 1312	1309 – 1311	1313
С–О–С	1069	1063 – 1068	1065 – 1070	1064 – 1068	1064 – 1066	1065
С–О	1008	1008 – 1026	1026 – 1028	1026 – 1028	1025 – 1026	1026 – 1027

Спектри ІЧ-спектру з перетворенням Фур'є підтвердили, що смуги 3434, 3330–3130, 1619, 1552, 1375 та 1307 см^{-1} , характерні для хітину, пояснюються валентними зв'язками О–Н; N–H; та амідів I, II, III відповідно. Всі ці смуги присутні та подібні в хітині, екстрагованому з плодових тіл кожного виду грибів.

На основі ІЧ-спектрів Фур'є можна зробити висновок, що хітин, екстрагований з грибів, та комерційно доступний хітин креветок мають велику схожість щодо типів зв'язків та хімічного складу. Ми також спостерігали, що широка смуга поглинання близько 1530–1560 см^{-1} , яка пояснюється білковою смугою (амід II), присутня у всіх хітинах, екстрагованих з грибів. Однак ця смуга досить різка в ІЧ-спектрі хітину з креветок. Ці смуги адсорбції можна віднести до меланіну. Згідно з літературою, меланін може бути ковалентно зв'язаний з аміногрупою N–ацетил–D–глюкозаміну. Попередником різних типів меланіну є амінокислоти [148].

Висновки до розділу 6

Згідно з літературою, *Aphyllorphorales*, які є ксилофагами, дереворуйнівними грибами, мають нижчий вміст хітину. Інші види рядів *Boletales*, *Agaricales* та *Russulales* мають вищий вміст хітину у своїх плодових тілах (8%–9% від сухої ваги). Гриби, які ми оцінювали в цьому дослідженні, належать переважно до ряду *Aphyllorphorales*. Ми вивчали ці гриби як потенційне джерело сквалену та стероїдних речовин. Розглядали можливість використання екстрактів, що залишилися після екстракції ліпофільних, спирторозчинних та водорозчинних речовин, для виробництва хітину. Зроблено висновок, що вміст хітину у плодових тілах невисокий, його екстракція потребує використання сильних кислот або агресивних розчинників при низьких температурах. При цьому спостерігається його гідроліз. Виходячи з наших результатів лужний гідроліз хітинвмісного матеріалу плодових тіл грибів з подальшим виробництвом хітозану є більш раціональним підходом. Хоча екстракція концентрованою HCl, дозволяє отримати хітин, прямий метод отримання хітину з практичної точки зору, вона все ж недоцільна через високий ризик гідролізу хітину, що неминуче збільшує його втрати. Очевидно, що лише за комплексного використання сировини плодових тіл цих грибів отримання хітину є доцільним. Одержаний грибний хітозан відрізняється від хітозану креветок меншою молекулярною масою, ступенем деацетилювання та наявністю домішок фенольної та вуглеводної природи.

Хітин, екстрагований з плодових тіл концентрованою HCl, містить пігмент, який не видаляється повністю навіть після повторного розчинення. Згідно з літературними даними, він ковалентно декорований β -глюканом [149] і, можливо, меланіном, що надає йому темного кольору. Однак після повторного осадження хітин став світлішим, і його вихід становив 25%–30% від початково екстрагованого хітину. Згідно з літературними даними, взаємодії між

хітином і глюканом у грибах часто мають ковалентний характер [149,150], тому хітин грибів відрізняється за своїми властивостями від хітину ракоподібних.

Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [151,152]

РОЗДІЛ 7

ПОШУК МЕТОДІВ ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ СКВАЛЕНУ В ЕКСТРАКТАХ ГРИБІВ

7.1. Мета дослідження

У ліпофільному екстракті молодих плодових тіл *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill вміст сквалену досить високий, але його маса незначна, крім того, кількість сквалену швидко зменшується зі старінням плодових тіл грибів. Тому це джерело не може конкурувати з амарантовою олією. Однак існують речовини, які пригнічують перетворення сквалену на стероїдні речовини, що може спричинити його накопичення в грибному матеріалі. Мета дослідження полягала в тому щоб розробити метод підвищення вмісту сквалену в плодових тілах впливаючи на біосинтез речовин.

7.2. Тербінафіну гідрохлорид, як засіб для збільшення кількості сквалену в плодових тілах грибів

Основною фармакологічно активною речовиною протигрибкових препаратів, таких як Атифан, Екзіфін, Фунготек, Ламізил, є тербінафіну гідрохлорид. Дія тербінафіну здійснюється шляхом пригнічення ферменту скваленепоксидази в клітинній мембрані гриба. Це призводить до дефіциту ергостеролу та внутрішньоклітинного накопичення сквалену, що спричиняє загибель грибкової клітини. Тербінафін – це аліламін (Рис. 7.1.), який має широкий спектр протигрибкової активності проти інфекцій шкіри, волосся та нігтів, спричинених дерматофітами, такими як *Trichophyton* (наприклад, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*), *Microsporum* (наприклад, *Microsporum canis*), *Epidermophyton floccosum*, дріжджі роду *Candida* (наприклад, *Candida albicans*) та *Pityrosporum*.

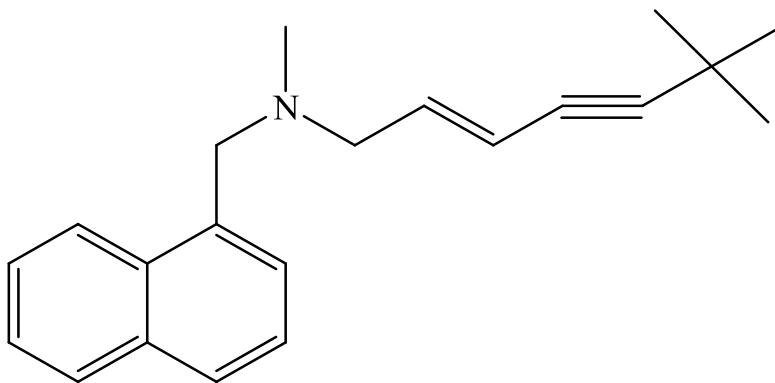


Рис. 7.1. Структурна формула тербінафіну

У низьких концентраціях тербінафін проявляє фунгіцидну дію проти дерматофітів, цвілі та деяких диморфних грибів. Активність проти дріжджових грибів, залежно від їх виду, може бути фунгіцидною або фунгістатичною.

Однак, вплив тербінафіну на дерматофітні гриби може суттєво відрізнятись від впливу цієї речовини на гриби, які вражають стовбури дерев. Відомо, що ергостерол не утворюється в культивованих грибах на дерев'яній підкладці, таких як гриби (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.), вирощені без доступу сонячного світла. У наших експериментах з вивчення ліпофільних речовин, отриманих з дикого та культивованого *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., описаних в розділі 5, було виявлено, що гриби, вирощені в прохолодних умовах без сонячного світла (фірма "Добрий Гриб", с. Лавриків, Львівська область), не містять вітаміну Е та D₂. Очевидно, що наявність або відсутність стероїдних сполук не є критичною умовою для існування та успішного росту цих грибів. Тому було б досить цікаво перевірити вплив подібного препарату на ксилотрофні гриби за впливом можливого накопичення сквалену в їхніх плодових тілах.

Нами було поставлене завдання розробити спосіб підвищення кількості сквалену у ліпофільних екстрактах плодових тіл плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.). Поставлена задача вирішується тим, що плодове тіла *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. протягом їх активного росту

обприскують 1% розчином тербінафіну, який інгібує фермент скваленоксидазу. Це приводить до блокування подальшого перетворення синтезованого у плодових тілах сквалену у стероїдні сполуки і накопичення сквалену у сировині [153].

7.3. Сквален одержаний з плодів щириці, як зразок для порівняння.

Існує спосіб одержання сквалену з природньої сировини, де використовується олія з насіння щириці *Amaranthus cruentus* - виду, який накопичує його в найбільшій кількості [154]. Згідно цього способу одержували олію з подрібненого насіння щириці шляхом екстракції петролейним ефіром (Ткип. = 40 -60°C). Далі олію омилювали розчином лугу (KOH) у 95% етанолі, після чого сквален виділяли з неомилювальної частини олії шляхом хроматографії на колонці силікагелю. Вміст олії у цій сировині сягав 7,7%, у якій було знайдено 4,7% сквалену. Це означає, що із 100 г. насіння *Amaranthus cruentus* можна одержати 0,36 г сквалену.

Недоліком описаного способу є тривалий період вегетації, необхідний для плодоношення щириці і складність проведення агротехнічних заходів по збільшенню урожайності або впливу на вміст сквалену у сировині.

Найближчим до за технічною суттю та досягнутим ефектом є спосіб одержання субстанції, що містить сквален із плодових тіл плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.), що включає екстракцію висушених подрібнених плодових тіл петролейним ефіром [134]. В залежності від фази росту плодових тіл вихід ліпофільного екстракту становив 0,08 – 1,28%, а вміст сквалену у ньому коливався від 1,78% до 8,72%. Це означає, що із 100 г висушених плодових тіл можна одержати до 0,11 г сквалену.

7.4. Опис експерименту по збільшенню вмісту сквалену в грибах

Плодові тіла грибів *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., вирощували на двох блоках субстрата (солома з лушпинням соняшника), які були інокульовані

грибницею На грибах з одного блоку проводився дослід, а гриби з другого використовувалися в якості контролю. Гриби проростали в слабо затіненому місці на подвір'ї, де пряме сонячне світло могло їх освітлювати протягом дня. Субстрат поливали водою двічі на день. Через дві доби після появи плодових тіл і досягнення розмірів шапки у 4 см. довжини і 7 см. ширини зовнішню поверхню плодових тіл обприскували 1% розчином тербінафіну гідрохлориду. Для цього використовували препарат "Тербофін", 1% спрей для зовнішнього застосування у флаконах по 30 мл. Цей препарат використовується при грибкових інфекціях шкіри. Обприскування проводили один або двічі на день протягом 6 або 7 днів. На 100 см² плодових тіл грибів витрачалось 0,3 – 0,5 мл 1% розчину препарату. Порівнюючи з контрольними зразками, обприскування тербінафіном суттєво не впливало на ріст і розвиток плодових тіл. Відмічалось лише закручування пластинок плодових тіл та дещо темніший колір їх зовнішньої поверхні.

Після останнього обприскування плодові тіла досліджуваного і контрольного зразків зрізали і висушували в сушильній шафі при температурі 55–65°C протягом 10–12 годин. Після цього висушений матеріал подрібнювали на електромлинку, часточки просіювали через сито (d= 1 мм) і екстрагували петролейним ефіром (Ткип. – 40–60°C) в апараті Сокслета протягом 60 хв. Одержаний екстракт фільтрували через паперовий фільтр і центрифугували, для видалення залишків шроту. Петролейний ефір відганяли до невеликого об'єму і рештки петролейного ефіру випарювали в сушильній шафі при температурі 55–65 °С. Сухий залишок повторно розчиняли в 10 мл. петролейного ефіру на водяній бані при температурі 40–50 °С. Осад, що не розчинився відділяли центрифугуванням і повторно розчиняли в 1 мл. петролейного ефіру на водяній бані при температурі 40–50 °С. Ще раз центрифугували, надосади об'єднували. Після цього визначали масу одержаного екстракту.

Було проведено три досліді в 2025 році, в серпні, вересні і жовтні (відповідно). У дослідів був ряд відмінностей, опис яких представлений в Табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

Перелік відмінностей між дослідями

Умови	Час проведення досліді		
	серпень	вересень	жовтень
Освітлення прямим сонячним світлом (хв.)	60 – 120	30 – 90	20 – 60
Діапазон коливань денної температури (°C)	+24 - +28	+16 - +22	+9 - +14
Діапазон коливань нічної температури (°C)	+14 - +18	+8 - +11	+3 - +7
Кількість обприскувань на добу	2	2	1
Інтервал між обприскуваннями (год.)	10 – 14	10 – 14	22 – 26
Кількість днів протягом яких здійснювалися обприскування	7	7	6

7.5. Результати досліджень

Аналіз одержаного ліпофільного екстракту здійснювали за допомогою газової хроматографії мас-спектрометрії.

Для серпневого досліді спостерігалось збільшення сквалену в ліпофільному екстракті плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. в 28 раз в порівнянні з контролем, і в 29,5 раз при розрахунку в грамах на 100 грам сухої сировини. Ергостероли в досліджуваному зразку були повністю відсутні, на відміну від контрольного зразка. Що вказує на успішність експерименту по втручанню в процеси біосинтезу "мевалонатного шляху". В досліджуваному зразку були залишки тербінафіну, якого не було в контрольному зразку. З чого можна зробити висновок, що кількість використаного тербінафіну була більше ніж достатньою. Також спостерігалось суттєве зменшення фталатів,

вуглеводнів та інших речовин в порівнянні з контролем. Результати аналізу предствалені в Табл. 7.2. (Рис. 7.1.)

Таблиця.7.2.

Аналіз ліпофільних залишків досліду і контролю плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. вирощених в серпні

Речовина	Вміст (у %)	
	контроль	дослід
Сквален	2,33	65,43
Сума ергостеролів	9,17	-
Тербінафін	-	10,14
Фталати	15,45	4,37
Вуглеводні (ейкозан та інші)	42,59	5,99
Сума не ідентифікованих речовин	30,46	14,07
Сума речовин	100,00	100,00
	Маса (г.)	
	контроль	дослід
Загальна маса групи вирощених грибів (після висушування)	32,5	24,0
Маса одержаного ліпофільного екстракту	1,18	1,26
Теоретичний вихід сквалену із 100 г висушених грибів	0,027	0,82



Рис. 7.1. Плодові тіла гливи (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) серпневого досліду, контрольний зразок і досліджуваний.

У вересневому досліді спостерігалось збільшення вмісту сквалену в 12,7 раз і в 13,5 раз при розрахунку в грамах на 100 грам сухої сировини. І хоча вміст сквалену в досліджуваному зразку і його теоретичний вихід в розрахунку на 100 г сухої сировини в вересневому досліді мало чим відрізнявся від серпневого (61,05% проти 65,43% і 0,794 г. проти 0,82 г.), в контрольних зразках вирощених в вересні кількість сквалену була в 2 рази вищою, а кількість ергостеролів в 5 раз більшою ніж в контрольних зразках вирощених в серпні. Що наводить на думку про вищу активність біосинтезу біологічно-активних речовин по "мевалонатному шляху" в *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. в вересні місяці. На це також вказує наявність досить значної кількості ергостеролів в досліджуваному зразку (31,56%), при тому, що в серпневому досліді ергостеролів в досліджуваному зразку не було зовсім. З чого можна зробити висновок, що кількість тербінафіну витраченого на дослід виявилася недостатньою для повного блокування перетворення сквалену в оксидосквален і біосинтез по "мевалонатному шляху" продовжувався, хоч і з меншою інтенсивністю (31,56% ергостеролів в досліді проти 50,11% в контролі). Тобто можна припустити, що якби в вересні досліджуваний зразок отримав більші дози тербінафіну (а дозування ми не змінювали) то вихід сквалену в вересневому досліді міг бути ще більшим. І хоча в досліджуваних зразках вирощених в вересні присутні залишки тербінафіну, їх в 3,5 рази менше ніж в серпневому досліді, і їх наявність можна пояснити залишками препарату які не встигли прореагувати після останнього обприскування сьомого дня. Цей останній день припав на п'ятницю і для того щоб встигнути успішно висушити сировину, її збирали через декілька годин після обприскування, тоді як в серпневому досліді між останнім обприскуванням і збором сировини пройшов цілий день. Аналогічно як і в серпневому досліді спостерігалось зменшення кількості фталатів, вуглеводнів та інших речовин. Результати аналізу предствалені в Табл. 7.3. (Рис. 7.2.)

Аналіз ліпофільних залишків досліду і контролю плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. вирощених в вересні

Речовина	Вміст (у %)	
	контроль	дослід
Сквален	4,81	61,05
Сума ергостеролів	50,11	31,56
Тербінафін	-	2,89
Фталати	9,87	0,50
Вуглеводні (ейкозан та інші)	19,92	2,11
Сума не ідентифікованих речовин	15,29	1,89
Сума речовин	100,00	100,00
	Маса (г.)	
	контроль	дослід
Загальна маса групи вирощених грибів (після висушування)	28,5	35,0
Маса одержаного ліпофільного екстракту	1,22	1,30
Теоретичний вихід сквалену із 100 г висушених грибів	0,059	0,794



Рис. 7.2. Плодові тіла гливи (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) вересневого досліду, контрольний зразок і досліджуваний.

В жовтневому досліді ми зменшили кількість обприскувань в день тербінафіном з 2 до 1, а в останній сьомий день обприскування не проводилися

зовсім. Ціль таких змін полягала в тому, що нас зацікавило як буде виглядати співвідношення речовин між досліджуваним зразком і контрольним в ситуації коли тербінафіну буде явно недостатньо для блокування біосинтезу по "мевалонатному шляху". В результаті закручування пластинок плодових тіл у досліджуваного зразка стало менш виражене (Рис. 7.3.).



Рис. 7.3. Плодові тіла гливи (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) жовтневого досліджу.

Вміст сквалену в досліджуваному зразку виріс лише в 2 рази. При тому що вміст сквалену в контролі виріс в 2 рази порівнюючи з вересневим дослідом і в 4 рази порівнюючи з серпневим. Також значно зросла кількість ергостеролів. З чого можна зробити висновок, що умови зовнішнього середовища в жовтні для проростання плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. є більш сприятливі для накопичення сквалену ніж в попередні місяці. Як ми і розраховували залишків тербінафіну в досліджуваному зразку виявлено не було. Проте, хоч ми і розраховували на збільшений вміст суми ергостеролів, в досліджуваному зразку він виявився напрочуд низький, в 10 раз менший ніж в контролі, при тому, що в вересневому досліді, вміст ергостеролів був лише в 1,5 рази менший ніж в контролі. Однак суттєво зріс вміст вуглеводнів, як в

порівнянні з жовтневим контролем, так і з попередніми дослідями. Результати аналізу предствалені в Табл. 7.4. (Рис. 7.4.)

Таблиця 7.4.

Аналіз ліпофільних залишків досліду і контролю плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. вирощених в жовтні

Речовина	Вміст (у %)	
	контроль	дослід
Сквален	8,82	16,70
Сума ергостеролів	82,1	7,96
Тербінафін	-	-
Фталати	0,62	-
Вуглеводні (ейкозан та інші)	6,52	66,34
Сума не ідентифікованих речовин	1,94	9,00
Сума речовин	100,00	100,00
	Маса (г.)	
	контроль	дослід
Загальна маса групи вирощених грибів (після висушування)	28,0	23,7
Маса одержаного ліпофільного екстракту	2,09	2,21
Теоретичний вихід сквалену із 100 г висушених грибів	0,18	0,37

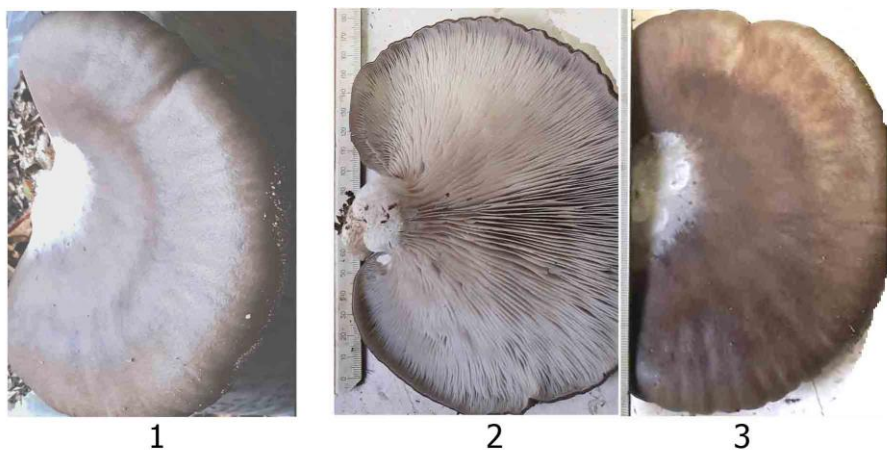


Рис. 7.4. Плодові тіла гливи (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) після обробки тербінафіном

1 – контроль (без обробки); 2, 3 – після обробки тербінафіном

В останньому (жовтневому) досліді вихід сквалену (16,70%) в 3,5-4 рази менший ніж в двох попередніх дослідях (65,43% і 61,05%). Тоді як теоретичний вихід сквалену з 100 г сухої речовини в жовтневому досліді (0,37 г.) виявився в тільки в 2 рази менший, ніж в двох попередніх дослідях (0,82 г. і 0,794 г.). Дана відмінність обумовлена більшою масою ліпофільного екстракту в жовтневому досліді. Зменшення теоретичного виходу сквалену в 2 рази корелюється зі зменшенням дозування тербінафіну, так як кількість обприскувань в жовтні ми зменшили з двох до одного на добу. З чого можна зробити попередній висновок, що вміст сквалену в досліджуваних зразках знаходиться в прямій залежності від кількості отриманого інгібітора. Тоді як зміни умов зовнішнього середовища більше впливають на потенціальні можливості по збільшенню вмісту сквалену в плодових тілах. (Табл. 7.5.)

Таблиця 7.5.

Аналіз ліпофільних залишків всіх трьох дослідів плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. вирощених за три місяці

Речовина	Вміст (у %)		
	серпень	вересень	жовтень
Сквален	65,43	61,05	16,70
Сума ергостеролів	-	31,56	7,96
Тербінафін	10,14	2,89	-
Фталати	4,37	0,50	-
Вуглеводні (ейкозан та інші)	5,99	2,11	66,34
Сума не ідентифікованих речовин	14,07	1,89	9,00
Сума речовин	100,00	100,00	100,00
	Маса (г.)		
	серпень	вересень	жовтень
Загальна маса групи вирощених грибів (після висушування)	24,0	35,0	23,7
Маса одержаного ліпофільного екстракту	1,26	1,30	2,21
Теоретичний вихід сквалену із 100 г висушених грибів	0,82	0,794	0,37

Висновки до розділу 7

Таким чином, при обприскуванні 1% розчином тербінафіну плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (протягом 7 днів в залежності від умов вирощування та обприскування розчином тербінафіну вміст сквалену може збільшитись у 2 – 28 разів і досягати 0,82 г на 100 г висушених плодових тіл. Останнє значення перевищує у 2,2 рази кількість сквалену, яка може бути одержана з 100 г насіння *Amaranthus cruentus*.

Такий спосіб збільшення кількості сквалену в грибній сировині може бути актуальним і для інших ксилотрофних грибів, так як умови необхідні для їх успішного проростання досить схожі. А враховуючи, що при штучному відтворенні цих умов ксилотрофні гриби можуть плодоносити практично протягом всього року, вони можуть стати цінним джерелом сквалену.

Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [155].

ВИСНОВКИ

1. Розроблена комплексна методика отримання ліпофільних, водних і спиртових екстрактів, з одного зразка сировини плодів щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) в один технологічний цикл. Розроблена оптимальна схема почерговості екстракцій для найбільш раціонального використання сировини з максимальним виходом найбільш цінних біологічно-активних речовин в один технологічний цикл. Розроблена методика отримання біологічно-активних речовин з надземної частини щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.), яка залишається після одержання насіння. На основі цих даних отримано патент України на корисну модель №148769, опубл. 15.09.2021, бюл. № 37, 5 с. Додаток Г.

2. Проаналізовано 21 вид грибів на вміст сквалену і інших біологічно-активних речовин, як потенційних сировинних джерел сквалену. Із проаналізованих зразків виділені найбільш перспективні види: *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst. та *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.. Розроблені методики виділення і очищення сквалену з досліджуваних зразків грибів.

3. Досліджено динаміку змін вмісту сквалену та інших біологічно-активних речовин в плодових тілах залежно від їх стадії зрілості для видів: *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. і *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui. Встановлено, що на ранніх стадіях зрілості вміст сквалену найбільший.

4. Для *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. проведено порівняльний аналіз вмісту біологічно-активних речовин для дикорослих і культивованих форм. Встановлено, що культивовані форми містять суттєво менше сквалену, ніж дикорослі форми.

5. Проведені дослідження на вміст хітину в шроті з плодових тіл грибів, який залишається після попередніх екстракцій в рамках комплексного використання сировини. Розроблені методики виділення і очищення хітину з плодових тіл видів: *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst., *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Lycoperdon perlatum* Pers. та *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui. Проведено визначення молекулярної маси і ІЧ-спектроскопію отриманого хітину.

6. Проведені дослідження по збільшенню вмісту сквалену в плодових тілах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. внаслідок інгібування скваленоксидази тербінафіном гідрохлоридом. Досліджено вміст біологічно-активних речовин в ліпофільних екстрактах. Встановлено, що таким способом можна отримати в рази більший вихід сквалену на 100 г. сухої сировини ніж з найбільш поширеного рослинного джерела сквалену роду щириці (*Amaranthus*).

ЖИТЕПАТУПА

1. Popa, O., Băbeanu, N. E., Popa, I., Niță, S., & Dinu-Pârvu, C. E. (2015). Methods for obtaining and determination of squalene from natural sources. *BioMed research international*, 2015(1), 367202.
2. Lippi, G., Targher, G., & Franchini, M. (2010). Vaccination, squalene and anti-squalene antibodies: facts or fiction? *European journal of internal medicine*, 21(2), 70-73.
3. Tsujimoto, M. (1920). Squalene: a highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil. *Industrial & Engineering Chemistry*, 12(1), 63-72.
4. Patel, A., Bettiga, M., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2022). Microbial genetic engineering approach to replace shark livering for squalene. *Trends in Biotechnology*, 40(10), 1261-1273.
5. Ackman, R. G. (1989). *Marine biogenic lipids, fats and oils* (Vol. 2). CRC press. p. 42-43
6. Mendes, A., Azevedo-Silva, J., & Fernandes, J. C. (2022). From sharks to yeasts: Squalene in the development of vaccine adjuvants. *Pharmaceuticals*, 15(3), 265.
7. Spanova, M., & Daum, G. (2011). Squalene–biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *European journal of lipid science and technology*, 113(11), 1299-1320.
8. Pan, J. J., Solbiati, J. O., Ramamoorthy, G., Hillerich, B. S., Seidel, R. D., Cronan, J. E., ... & Poulter, C. D. (2015). Biosynthesis of squalene from farnesyl diphosphate in bacteria: three steps catalyzed by three enzymes. *ACS central science*, 1(2), 77-82.
9. Baraniak, J., & Kania-Dobrowolska, M. (2022). The dual nature of amaranth — functional food and potential medicine. *Foods*, 11(4), 618.

10. Srivastava, S., Sreerama, Y. N., & Dharmaraj, U. (2021). Effect of processing on squalene content of grain amaranth fractions. *Journal of Cereal Science*, 100, 103218.
11. Ambra, R., Natella, F., Lucchetti, S., Forte, V., & Pastore, G. (2017). α -Tocopherol, β -carotene, lutein, squalene and secoiridoids in seven monocultivar Italian extra-virgin olive oils. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(5), 538-545.
12. Mastralexi, A., & Tsimidou, M. Z. (2021). On the squalene content of CV Chondrolia Chalkidikis and Chalkidiki (Greece) virgin olive oil. *Molecules*, 26(19), 6007.
13. Joshi, N., Verma, K. C. (2020). A review on nutrition value of Amaranth (*Amaranthus caudatus* L.): The crop of future. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 317-319.
14. Martinez-Lopez, A., Millan-Linares, M. C., Rodriguez-Martin, N. M., Millan, F., & Montserrat-de la Paz, S. (2020). Nutraceutical value of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of Functional Foods*, 65, 103735.
15. Jimoh, M. O., Afolayan, A. J., & Lewu, F. B. (2020). Nutrients and antinutrient constituents of *Amaranthus caudatus* L. Cultivated on different soils. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3570-3580.
16. А Бурд, Н. Б. (2006) Фармакогностичне вивчення деяких представників роду амарант (Doctoral dissertation, Харків).
17. Заремба, Є. Х., Заремба-Федчишин, О. В., Заремба, О. В., Федчишин, Н. Р., & Фостяк, І. М. (2010). Застосування олії амаранту у кардіологічній практиці. *Фітотерапія*, (1), 15-18.
18. Коник, У. В., & Козак, Л. П. (2024). Застосування інтервального гіпоксичного тренування та олії амаранту за умов хронічної фторидної інтоксикації. *Фізіологічний журнал*, 70 (5), 72-77.
19. Krychkovska, L., Khokhlenkova, N., Blyzniuk, O., Shcherbak, O., & Dubonosov, V. (2024). Бад в засобах з амарантом та каротином

мікробіологічним для лікування тварин. International Science Journal of Engineering & Agriculture, 3(3), 73-81.

20. Mykolenko, S., Zhygunov, D., & Rudenko, T. (2020). Baking properties of different amaranth flours as wheat bread ingredients. Food Science and Technology, 14(4).

21. Kumar, B. S. A., Lakshman, K., Jayaveera, K. K. N., Shekar, D. S., Muragan, C. S. V., & Manoj, B. (2009). Antinociceptive and antipyretic activities of *Amaranthus viridis* Linn in different experimental models. Avicenna journal of medical biotechnology, 1(3), 167.

22. Kumar, A., Lakshman, K., Jayaveera, K. N., Nandeesh, R., Manoj, B., & Ranganayakulu, D. (2010). Comparative in vitro anthelmintic activity of three plants from the Amaranthaceae family. Archives of Biological Sciences, 62(1), 185-189.

23. Rastrelli, L., Pizza, C., Saturnino, P., Schettino, O., & Dini, A. (1995). Studies on the constituents of *Amaranthus caudatus* (Kiwicha) seeds. Isolation and characterization of seven new triterpene saponins. Journal of agricultural and food chemistry, 43(4), 904-909.

24. Antonyuk, R. V., & Lutsik, O. D. (2015). Lectinohistochemical research of colon in humans at normal and at neoplastic process using lectins specific for T antigen and N-acethylactosamine. World of Medicine and Biology, 11(49), 073-078.

25. Rinderle, S. J., Goldstein, I. J., Matta, K. L., & Ratcliffe, R. M. (1989). Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T-(or cryptic T)-antigen. Journal of Biological Chemistry, 264(27), 16123-16131.

26. Shene, C., Leyton, A., Flores, L., Chavez, D., Asenjo, J. A., & Chisti, Y. (2024). Genome-scale metabolic modeling of *Thraustochytrium* sp. RT2316-16: Effects of nutrients on metabolism. Biotechnology and Bioengineering, 121(6), 1986-2001.

27. Kaya, K., Nakazawa, A., Matsuura, H., Honda, D., Inouye, I., & Watanabe, M. M. (2011). Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a

accumulates high amounts of squalene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(11), 2246-2248.

28. Schütte, L., Hanisch, P. G., Scheler, N., Haböck, K. C., Huber, R., Ersoy, F., & Berger, R. G. (2024). Squalene production under oxygen limitation by *Schizochytrium* sp. S31 in different cultivation systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 201.

29. Paramasivan, K., & Mutturi, S. (2022). Recent advances in the microbial production of squalene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(5), 91.

30. Hamidi, M., Okoro, O. V., Milan, P. B., Khalili, M. R., Samadian, H., Nie, L., & Shavandi, A. (2022). Fungal exopolysaccharides: Properties, sources, modifications, and biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 284, 119152.

31. Daou, M., Yassine, B., Wikee, S., Record, E., Duprat, F., Bertrand, E., & Faulds, C. B. (2019). *Pycnoporus cinnabarinus* glyoxal oxidases display differential catalytic efficiencies on 5-hydroxymethylfurfural and its oxidized derivatives. *Fungal biology and biotechnology*, 6(1), 4.

32. Kurchenko, V. P., Sushinskaya, N. V., Kiseleva, I. S., & Ermoshin, A. A. (2022, February). Biologically active substances in fruit bodies of wood decomposing fungi. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2390, No. 1, p. 030045). AIP Publishing LLC.

33. Asgharpour, F., Moghadamnia, A. A., Alizadeh, Y., & Kazemi, S. (2020). Chemical Composition and antibacterial activity of hexane extract of *Lycoperdon pyriforme*. *South African Journal of Botany*, 131, 195-199.

34. Landínez-Torres, A. Y., Pérez Fagua, C., López, A. C. S., Deaquiz Oyola, Y. A., & Girometta, C. E. (2021). Pruning wastes from fruit trees as a substrate for *Pleurotus ostreatus*. *Acta Mycologica*, 56(1).

35. Regis, M. A. J., Geösel, A., & Geösel, R. M. (2024). Cultivation of *Auricularia* species: a review of the history, health benefits, principles, practices, environmental conditions, research methods, and recent trends. *Sydowia*, 76, 21.

36. Kobayashi, T., Oguro, M., Akiba, M., Taki, H., Kitajima, H., & Ishihara, H. (2020). Mushroom yield of cultivated shiitake (*Lentinula edodes*) and fungal communities in logs. *Journal of Forest Research*, 25(4), 269-275.
37. Muswati, C., Simango, K., Tapfumaneyi, L., Mutetwa, M., & Ngezimana, W. (2021). The effects of different substrate combinations on growth and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *International Journal of Agronomy*, 2021(1), 9962285.
38. Fufa, B. K., Tadesse, B. A., & Tulu, M. M. (2021). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on agricultural wastes and their combination. *International Journal of Agronomy*, 2021(1), 1465597.
39. Karataş, A. (2022). Effects of different agro-industrial waste as substrates on proximate composition, metals, and mineral contents of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *International Journal of Food Science and Technology*, 57(3), 1429-1439.
40. Grimm, A., Eilertsen, L., Chen, F., Huang, R., Atterhem, L., & Xiong, S. (2021). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* mushroom on substrates made of cellulose fibre rejects: product quality and spent substrate fuel properties. *Waste and Biomass Valorization*, 12(8), 4331-4340.
41. Lin, P., Yan, Z. F., Kook, M., Li, C. T., & Yi, T. H. (2022). Genetic and chemical diversity of edible mushroom *Pleurotus* species. *BioMed research international*, 2022(1), 6068185.
42. Mleczek, M., Gąsecka, M., Budka, A., Niedzielski, P., Siwulski, M., Kalač, P., ... & Rzymiski, P. (2021). Changes in mineral composition of six strains of *Pleurotus* after substrate modifications with different share of nitrogen forms. *European Food Research and Technology*, 247(1), 245-257.
43. Torres-Martínez, B. D. M., Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Esqueda, M., Rodríguez-Carpena, J. G., Fernández-López, J., ... & Sánchez-Escalante, A. (2022). *Pleurotus* genus as a potential ingredient for meat products. *Foods*, 11(6), 779.

44. Urbancikova, I., Hudackova, D., Majtan, J., Rennerova, Z., Banovcin, P., & Jesenak, M. (2020). Efficacy of Pleuran (β -Glucan from *Pleurotus ostreatus*) in the Management of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1), 8562309.
45. Schiano, I., Raco, S., Cestone, E., Jesenak, M., Rennerova, Z., & Majtan, J. (2021). Pleuran- β -Glucan from oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes), soothes and improves skin parameters. *International journal of medicinal mushrooms*, 23(12).
46. Antonyuk, V., Panchak, L., Manko, N., & Stoika, R. (2020). Chitosan of peppery milky cap fungi (*Lactarius Pergamenus* (Fr.) Fr): Isolation, study of physico-chemical properties and biological activity. *Revista de Chimie*, 70(9), 230-241.
47. Dargude Namrata, S., & Patil Rupali, A. (2021). Clinical usefulness of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* in various disease states: a comparative study. *Journal of Advanced Scientific Research*, 12(4), 47-52.
48. Dicks, L., & Ellinger, S. (2020). Effect of the intake of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) on cardiometabolic parameters—A systematic review of clinical trials. *Nutrients*, 12(4), 1134.
49. Trejo-López, M. T., Ayala-Martínez, M., Zepeda-Bastida, A., Franco-Fernández, M. J., & Soto-Simental, S. (2021). Using spent *Pleurotus ostreatus* substrate to supplemented goats to increase fresh cheese yields. *Small Ruminant Research*, 195, 106297.
50. Zamora Zamora, H. D., Silva, T. A., Varão, L. H., Baffi, M. A., & Pasquini, D. (2023). Simultaneous production of cellulases, hemicellulases, and reducing sugars by *Pleurotus ostreatus* growth in one-pot solid state fermentation using *Alstroemeria* sp. waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(6), 4879-4892.

51. Hultberg, M., Ahrens, L., & Golovko, O. (2020). Use of lignocellulosic substrate colonized by oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) for removal of organic micropollutants from water. *Journal of Environmental Management*, 272, 111087.
52. Song, J., & Cui, B. K. (2017). Phylogeny, divergence time and historical biogeography of *Laetiporus* (Basidiomycota, Polyporales). *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 102.
53. Vasaitis, R., Menkis, A., Lim, Y. W., Seok, S., Tomsovsky, M., Jankovsky, L., ... & Stenlid, J. (2009). Genetic variation and relationships in *Laetiporus sulphureus* s. lat., as determined by ITS rDNA sequences and in vitro growth rate. *mycological research*, 113(3), 326-336.
54. O'Reilly, P. (2011). *Fascinated by fungi* (pp. 1-450). Ceredigion: First Nature.
55. Wu, S., Zorn, H., Krings, U., & Berger, R. G. (2005). Characteristic volatiles from young and aged fruiting bodies of wild *Polyporus sulfureus* (Bull.: Fr.) Fr. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4524-4528.
56. Grienke, U., Zöll, M., Peintner, U., & Rollinger, J. M. (2014). European medicinal polypores—A modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(3), 564-583.
57. Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *International Journal of medicinal mushrooms*, 1(1).
58. Weber, R. W., Mucci, A., & Davoli, P. (2004). Laetiporic acid, a new polyene pigment from the wood-rotting basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Tetrahedron letters*, 45(5), 1075-1078.
59. Davoli, P., Mucci, A., Schenetti, L., & Weber, R. W. (2005). Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Phytochemistry*, 66(7), 817-823.

60. Ericsson, D. C. B., & Ivonne, J. N. R. (2009). Sterol composition of the macromycete fungus *Laetiporus sulphureus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(2), 193-196.
61. Karrer, P., & Helfenstein, A. (1931). Synthese des Squalens. *Helvetica Chimica Acta*, 14(1), 78-85.
62. McMurry, J. E. (1989). Carbonyl-coupling reactions using low-valent titanium. *Chemical Reviews*, 89(7), 1513-1524.
63. Werthemann, L., & Johnson, W. S. (1970). Application of the chloro ketal Claisen reaction to the total synthesis of squalene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67(3), 1465-1467.
64. Werthemann, L., & Johnson, W. S. (1970). Application of the chloro ketal Claisen reaction to the total synthesis of squalene. Experimental details. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67(4), 1810-1813.
65. Ceruti, M., Grosa, G., Rocco, F., Dosio, F., & Cattell, L. (1994). A convenient synthesis of [3-3H] squalene and [3-3H]-2, 3-oxidosqualene. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 34(6), 577-585.
66. Chadwick, S. S. (1988). "Terpenes". *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Reference Services Review*, 16(4), 31-34.
67. Micera, M., Botto, A., Geddo, F., Antoniotti, S., Berteza, C. M., Levi, R., ... & Querio, G. (2020). Squalene: more than a step toward sterols. *Antioxidants*, 9(8), 688.
68. Cerqueira, N. M., Oliveira, E. F., Gesto, D. S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H. N., ... & Fernandes, P. A. (2016). Cholesterol biosynthesis: a mechanistic overview. *Biochemistry*, 55(39), 5483-5506.
69. Zandee, D. I. (1964). Absence of sterol synthesis in some arthropods. *Nature*, 202(4939), 1335-1336.
70. Bergstrom, J. D., Kurtz, M. M., Rew, D. J., Amend, A. M., Karkas, J. D., Bostedor, R. G., ... & Hensens, O. D. (1993). Zaragozic acids: a family of fungal

metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(1), 80-84.

71. Bergstrom, J. D., Dufresne, C., Bills, G. F., Nallin-Omstead, M., & Byrne, K. (1995). Discovery, biosynthesis, and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase. *Annual review of microbiology*, 49(1), 607-639.

72. Hidaka, Y., Hotta, H., Nagata, Y., Iwasawa, Y., Horie, M., & Kamei, T. (1991). Effect of a novel squalene epoxidase inhibitor, NB-598, on the regulation of cholesterol metabolism in Hep G2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(20), 13171-13177.

73. Do, R., Kiss, R. S., Gaudet, D., & Engert, J. C. (2009). Squalene synthase: a critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. *Clinical genetics*, 75(1), 19-29.

74. Wang, Z., Tang, M., Liu, S., Chen, J., Hua, Q., Lei, J., ... & Qin, J. (2025). Engineering Squalene Biosynthesis: Multi-level Metabolic Strategies for Future Foods. *Journal of Future Foods*.

75. Shalu, S., Karthikanath, P. K. R., Vaidyanathan, V. K., Blank, L. M., Germer, A., & Balakumaran, P. A. (2024). Microbial squalene: A sustainable alternative for the cosmetics and pharmaceutical industry—a review. *Engineering in Life Sciences*, 24(10), e202400003.

76. Wentzinger, L. F., Bach, T. J., & Hartmann, M. A. (2002). Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiology*, 130(1), 334-346.

77. Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., & Martínez-Ayala, A. L. (2018). Plant sources, extraction methods, and uses of squalene. *International journal of agronomy*, 2018(1), 1829160.

78. Tsimidou, M. Z. (2010). Squalene and tocopherols in olive oil: importance and methods of analysis. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 561-567). Academic Press.
79. Ronco, A. L., & De Stéfani, E. (2013). Squalene: a multi-task link in the crossroads of cancer and aging. *Functional Foods in Health and Disease-Online* ISSN: 2160-3855; Print ISSN: 2378-7007, 3(12), 462-476.
80. Nikkari, T., Schreibman, P. H., & Ahrens Jr, E. H. (1974). In vivo studies of sterol and squalene secretion by human skin. *Journal of Lipid Research*, 15(6), 563-573.
81. Huang ZihRou, H. Z., Lin YinKu, L. Y., & Fang JiaYou, F. J. (2009). Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology.
82. Pappas, A. (2009). Epidermal surface lipids. *Dermato-endocrinology*, 1(2), 72-76.
83. Kim, E. H., Woodruff, M. C., Grigoryan, L., Maier, B., Lee, S. H., Mandal, P., ... & Pulendran, B. (2020). Squalene emulsion-based vaccine adjuvants stimulate CD8 T cell, but not antibody responses, through a RIPK3-dependent pathway. *Elife*, 9, e52687.
84. Nguyen-Contant, P., Sangster, M. Y., & Topham, D. J. (2021). Squalene-based influenza vaccine adjuvants and their impact on the hemagglutinin-specific B cell response. *Pathogens*, 10(3), 355.
85. Li, Y., Tenchov, R., Smoot, J., Liu, C., Watkins, S., & Zhou, Q. (2021). A comprehensive review of the global efforts on COVID-19 vaccine development. *ACS central science*, 7(4), 512-533.
86. Ho, H. M., Huang, C. Y., Cheng, Y. J., Shen, K. Y., Tzeng, T. T., Liu, S. J., ... & Huang, M. H. (2021). Assessment of adjuvantation strategy of lipid squalene nanoparticles for enhancing the immunogenicity of a SARS-CoV-2 spike subunit protein against COVID-19. *International Journal of Pharmaceutics*, 607, 121024.

87. Park, K. S., Sun, X., Aikins, M. E., & Moon, J. J. (2021). Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 169, 137-151.
88. Kotelevets, L., Chastre, E., Caron, J., Mougin, J., Bastian, G., Pineau, A., ... & Couvreur, P. (2017). A squalene-based nanomedicine for oral treatment of colon cancer. *Cancer research*, 77(11), 2964-2975.
89. Ibrahim, N. I., Fairus, S., Zulfarina, M. S., & Naina Mohamed, I. (2020). The efficacy of squalene in cardiovascular disease risk-a systematic review. *Nutrients*, 12(2), 414.
90. Costa, C. N., Teixeira, V. G., Delpech, M. C., Souza, J. V. S., & Costa, M. A. (2015). Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride. *Carbohydrate polymers*, 133, 245-250.
91. Shen, W., Li, Y., Chen, H., Jin, Z., Xu, X., Zhao, J., & Xie, Z. (2009). Purification and application of α -galactosidase from germinating coffee beans (*Coffea arabica*). *European food research and technology*, 228(6), 969-974.
92. Amare, E., Grigoletto, L., Corich, V., Giacomini, A., & Lante, A. (2021). Fatty acid profile, lipid quality and squalene content of teff (*Eragrostis teff* (Zucc.) Trotter) and Amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) varieties from Ethiopia. *Applied Sciences*, 11(8), 3590.
93. Kaur, N., Dhuna, V., Kamboj, S. S., Agrewala, J. N., & Singh, J. (2006). A novel antiproliferative and antifungal lectin from *Amaranthus viridis* Linn seeds. *Protein and peptide letters*, 13(9), 897-905.
94. Mengoni, A., Quiroga, A. V., & Añón, M. C. (2016). Purificación y caracterización de una lectina de *Amaranthus hypochondriacus*, un compuesto antiproliferativo.
95. Hostettmann, K., & Marston, A. (2005). Saponins. (No Title), 1.
96. Wagner, J., & Bosse, J. (1964). U.S. Patent No. 3,163,636. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
97. Antonyuk, V. O. (2005). Lectins and their raw materials. Lviv: Kwart.

98. Maurer, H. R. (2011). Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Walter de Gruyter.
99. Овсієнко, С. М., & Соломон, А. М. (2022). Амарант: практичні аспекти використання. Вінниця: ТОВ "Друк", 2022. 151 с.
100. Jimoh, M. O., Afolayan, A. J., & Lewu, F. B. (2019). Antioxidant and phytochemical activities of *Amaranthus caudatus* L. harvested from different soils at various growth stages. *Scientific Reports*, 9(1), 12965.
101. Корабель І.М., Салабай С.І., Антонюк В.О. Спосіб одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів. / Патент України на корисну модель. № 126361, опубл. 11.06.2018, бюл. №11, 3 с.
102. Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2022). Obtaining biologically active substances from *Amaranthus caudatus* L. seeds in one technological cycle. *Biomedical chromatography*, 36(8), e5386.
103. Korabel' I. M., Panchak L. V., Zyn' A. R., Antonyuk V. O. Purification of fatty oil, lectin and a fraction rich in triterpenoids from the seeds of *Amaranthus caudatus* in one technological cycle. *Phytochemical Society of Europe Meeting 2022, September 19-22, Jasi, Romania*, p. 216.
104. Корабель І.М., Антонюк В.О. Комплексне використання надземної частини *Amaranthus caudatus*. X Міжнародна науково-практична конференція "Science of post-industrial society: globalization and transformation processes" 06 березня 2026 р. Вінниця, Україна - Відень, Австрія. с. 875-876.
105. Корабель Іван Михайлович, Панчак Лідія Володимирівна, Антонюк Володимир Олександрович. Спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) / Патент України на корисну модель №148769, опубл. 15.09.2021, бюл. № 37, 5 с.
106. Garuba, T., Abdukkareem, K. A., Ibrahim, I. A., Oyebamiji, O. I., Shoyooye, O. A., & Ajibade, T. D. (2017). Influence of substrates on the nutritional quality of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus*. *Ceylon Journal of Science*, 46(1).

107. Aghajani, H., Bari, E., Bahmani, M., Humar, M., Ghanbary, M. A. T., Nicholas, D. D., & Zahedian, E. (2018). Influence of relative humidity and temperature on cultivation of *Pleurotus* species. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 20(4), 571-578.
108. Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Squalene in fruiting bodies of true mushrooms changes in the process of vegetation. *Italian Journal of Mycology*, 54, 1-11.
109. Panchak L. V., Korabel' I. M., Zyn' A. R., Antonyuk V. O. Comparison of the chemical composition of lipophilic extracts of *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. and *Scleroderma aurantiacum* L. ex Pers. *Phytochemical Society of Europe Meeting 2022*, September 19-22, Jasi, Romania, p. 160.
110. He, J. B., Tao, J., Miao, X. S., Bu, W., Zhang, S., Dong, Z. J., ... & Liu, J. K. (2015). Seven new drimane-type sesquiterpenoids from cultures of fungus *Laetiporus sulphureus*. *Fitoterapia*, 102, 1-6.
111. Alquini, G., Carbonero, E. R., Rosado, F. R., Cosentino, C., & Iacomini, M. (2004). Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 47-52.
112. Khalilov, Q., Numonov, S., Sukhrobov, P., Bobakulov, K., Sharopov, F., Habasi, M., ... & Aisa, H. A. (2022). New triterpenoids from the fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* and their anti-inflammatory activity. *ACS omega*, 7(31), 27272-27277.
113. Jen, C. I., Lu, M. K., Lai, M. N., & Ng, L. T. (2024). Sulfated polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* fruiting bodies exhibit anti-breast cancer activity through cell cycle arrest, apoptosis induction, and inhibiting cell migration. *Journal of Ethnopharmacology*, 321, 117546.
114. Rapior, S., Kanska, G., Guillot, J., Andary, C., & Bessiere, J. M. (2000). Volatile composition of *Laetiporus sulphureus*. *Cryptogamie Mycologie*, 21(1), 67-72.

115. Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2018). Di-2-ethylhexylphthalate May Be a Natural Product, Rather than a Pollutant. *Journal of Chemistry*, 2018(1), 6040814.
116. Huang, L., Zhu, X., Zhou, S., Cheng, Z., Shi, K., Zhang, C., & Shao, H. (2021). Phthalic acid esters: Natural sources and biological activities. *Toxins*, 13(7), 495.
117. Thiemann, T. (2021). Isolation of phthalates and terephthalates from plant material—natural products or contaminants. *Open Chem. J*, 8(1), 10-2174.
118. Chen, C. Y. (2004). Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga—*Bangia atropurpurea*. *Water Research*, 38(4), 1014-1018.
119. Pyysalo, H., Berg, A., Lund, H., Devreux, M., Vialle, J., & Anthonsen, T. (1976). Identification of volatile compounds in seven edible fresh mushrooms. *Acta Chemica Scandinavica*, 30, 235-244.
120. Tsivinska, M. V., Antonyuk, V. O., Panchak, L. V., Klyuchivska, O. Y., & Stoika, R. S. (2015). Biologically active substances of methanol extracts of dried *Lactarius quietus* and *Lactarius volemus* basidiomes mushrooms: Identification and potential functions. *Biotechnologia Acta*, 8(2), 58-68.
121. Antonyuk, V. O., Panchak, L. V., Tsivinska, M. V., & Stoika, R. S. (2023). Substances of milky juice of genus *Lactarius* fungi: chemical and toxicological characteristics. *Venoms and Toxins*, 3(1), e220822207860.
122. Deacon, J. W. (2013). *Fungal biology*. John Wiley & Sons.
123. Krings, U., & Berger, R. G. (2014). Dynamics of sterols and fatty acids during UV-B treatment of oyster mushroom. *Food chemistry*, 149, 10-14.
124. Schmidt, O. (2006). *Wood and tree fungi: biology, damage, protection, and use*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
125. Mousa, Ū. A. (2021). The effect of ascorbate salts on mushroom (*Pleurotus ostreatus*) grown under salinity stress. *Egyptian Journal of Botany*, 61(1), 271-282.

126. Ahmad, A. S., & Hussien, A. M. (2021). Growth requirements of *Pleurotus ostreatus* and antagonistic potential against *Rhizoctonia solani*. *Plant Arch*, 21(2006), 798-801.
127. Sianturi, M., Bintang, & Sabrina, T. (2021, June). Effect of giving triple super phosphate and dolomite fertilizer on mushroom media (baglog) on production of white oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 782, No. 4, p. 042044). IOP Publishing.
128. Orngu, O. A., Mbaeyi-Nwaoha, I. E., Unagwu, B. O., & Etim, V. E. (2021). Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation using sawdust and different organic manures. *Asian Food Science Journal*, 20(5), 67-74.
129. Keflie, T. S., Nölle, N., Lambert, C., Nohr, D., & Biesalski, H. K. (2019). Impact of the natural resource of UVB on the content of vitamin D2 in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) under subtropical settings. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1724-1730.
130. Araújo, N. L., Avelino, K. V., Halabura, M. I. W., Marim, R. A., Kassem, A. S. S., Linde, G. A., ... & do Valle, J. S. (2021). Use of green light to improve the production of lignocellulose-decay enzymes by *Pleurotus* spp. in liquid cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 149, 109860.
131. Stienen, T., Schmidt, O., & Huckfeldt, T. (2014). Wood decay by indoor basidiomycetes at different moisture and temperature. *Holzforschung*, 68(1), 9-15.
132. Bari, E., Mohebbi, B., Naji, H. R., Oladi, R., Yilgor, N., Nazarnezhad, N., ... & Nicholas, D. D. (2018). Monitoring the cell wall characteristics of degraded beech wood by white-rot fungi: Anatomical, chemical, and photochemical study. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 20(1), 35-56.
133. Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., Vrubel, O. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Study of lipophilic substances of *Laetiporus sulphureus* (Bull. Fr) Murril at different stages of maturity of mushroom fruiting bodies. *Biomedical Chromatography*, 39(7), e70140.

134. Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Study of the chemical composition of the lipophilic extract of fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. *Asian Journal of Mycology*, 8(1): 156–164
135. Панчак Л.В., Корабель І.М., Врубель О.Р., Антонюк В.О. Дослідження водорозчинних полісахаридів плодових тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй, зібраних на різних стадіях їх розвитку. VII Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" 11 квітня 2025 р. Харків: НФаУ, с. 170-172.
136. Iber, B. T., Kasan, N. A., Torsabo, D., & Omuwa, J. W. (2022). A review of various sources of chitin and chitosan in nature. *Journal of Renewable Materials*, 10(4), 1097.
137. Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.
138. Ekblad, A., & Näsholm, T. (1996). Determination of chitin in fungi and mycorrhizal roots by an improved HPLC analysis of glucosamine. *Plant and Soil*, 178(1), 29-35.
139. Vetter, J. (2007). Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*, 102(1), 6-9.
140. El Knidri, H., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2020). Chitin and chitosan: chemistry, solubility, fiber formation, and their potential applications. In *Handbook of Chitin and Chitosan* (pp. 35-57). Elsevier.
141. Singh, S. K. (2019). Solubility of lignin and chitin in ionic liquids and their biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 265-277.

142. Wineinger, H. B., Shamshina, J. L., Kelly, A., King, C., & Rogers, R. D. (2020). A method for determining the uniquely high molecular weight of chitin extracted from raw shrimp shells using ionic liquids. *Green Chemistry*, 22(12), 3734-3741.
143. Poirier, M., & Charlet, G. (2002). Chitin fractionation and characterization in N, N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system. *Carbohydrate polymers*, 50(4), 363-370.
144. Li, G., Du, Y., Tao, Y., Liu, Y., Li, S., Hu, X., & Yang, J. (2010). Dilute solution properties of four natural chitin in NaOH/urea aqueous system. *Carbohydrate polymers*, 80(3), 970-976.
145. Omara, N., Elsebaie, E., Kassab, H., & Salama, A. (2019). Production of chitosan from shrimp shells by microwave technique and its use in minced beef preservation. *Slovenian Veterinary Research*, 56(22-Suppl).
146. Li, G., Du, Y., Tao, Y., Liu, Y., Li, S., Hu, X., & Yang, J. (2010). Dilute solution properties of four natural chitin in NaOH/urea aqueous system. *Carbohydrate polymers*, 80(3), 970-976.
147. Abo Elsoud, M. M., & El Kady, E. M. (2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-12.
148. Toledo, A. V., Franco, M. E. E., Lopez, S. M. Y., Troncozo, M. I., Saparrat, M. C. N., & Balatti, P. A. (2017). Melanins in fungi: types, localization and putative biological roles. *Physiological and molecular plant pathology*, 99, 2-6.
149. Chen, A., Pan, F., Zhang, T., Yu, C., Xiao, Y., Li, S., ... & Xu, Z. (2021). Characterization of chitin-glucan complex from *Tremella fuciformis* fermentation residue and evaluation of its antibacterial performance. *International journal of biological macromolecules*, 186, 649-655.
150. Arroyo, J., Farkaš, V., Sanz, A. B., & Cabib, E. (2016). Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. *Cellular Microbiology*, 18(9), 1239-1250.

151. Korabel, I., Khomyak, S., Panchak, L., & Antonyuk, V. (2023). Study of the Quantitative and Qualitative Changes in Chitin at Different Stages of Ripening of Mushroom Fruiting Bodies. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 28, 34-45.

152. Корабель І.М., Хом'як С.В., Панчак Л.В., Антонюк В.О. Кількісні та якісні зміни хітину на різних стадіях вегетації грибів-базидіоміцетів. В Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" 14 квітня 2023 р. Харків, с. 119-120.

153. Padyana, A. K., Gross, S., Jin, L., Cianchetta, G., Narayanaswamy, R., Wang, F., ... & Smolen, G. A. (2019). Structure and inhibition mechanism of the catalytic domain of human squalene epoxidase. *Nature communications*, 10(1), 97.

154. He, H. P., Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2002). Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(2), 368-372.

155. Корабель І.М., Панчак Л.В., Зінь А., Антонюк В.О. Спосіб підвищення кількості сквалену у ліпофільних екстрактах плевроту черепитчастого (*Pleurotus ostreatus*). / прийнятий до розгляду 10.02.2026, номер заявки: u202600666

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті

- Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2022). Obtaining biologically active substances from *Amaranthus caudatus* L. seeds in one technological cycle. *Biomedical chromatography*, 36(8), e5386. <https://doi.org/10.1002/bmc.5386> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)
- Korabel, I., Khomyak, S., Panchak, L., & Antonyuk, V. (2023). Study of the Quantitative and Qualitative Changes in Chitin at Different Stages of Ripening of Mushroom Fruiting Bodies. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 28, 34-45. <https://doi.org/10.15259/PCACD.28.004> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)
- Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Squalene in fruiting bodies of true mushrooms changes in the process of vegetation. *Italian Journal of Mycology*, 54, 1-11. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/19781> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)
- Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., Vrubel, O. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Study of lipophilic substances of *Laetiporus sulphureus* (Bull. Fr) Murril at different stages of maturity of mushroom fruiting bodies. *Biomedical Chromatography*, 39(7), e70140. <https://doi.org/10.1002/bmc.70140> (*Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку*)
- Korabel, I. M., Panchak, L. V., Zyn, A. R., & Antonyuk, V. O. (2025). Study of the chemical composition of the lipophilic extract of fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. *Asian Journal of Mycology*, 8(1): 156–164

DOI:10.5943/ajom/8/1/11 (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку)

Тези доповідей

Panchak L. V., Korabel' I. M., Zyn'A. R., Antonyuk V. O. Comparison of the chemical composition of lipophilic extracts of *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. and *Scleroderma aurantiacum* L. ex Pers. Phytochemical Society of Europe Meeting 2022, September 19-22, Jasi, Romania, p. 160. (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)

Korabel' I. M., Panchak L. V., Zyn'A. R., Antonyuk V. O. Purification of fatty oil, lectin and a fraction rich in triterpenoids from the seeds of *Amaranthus caudatus* in one technological cycle. Phytochemical Society of Europe Meeting 2022, September 19-22, Jasi, Romania, p. 216. (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)

Корабель І.М., Хом'як С.В., Панчак Л.В., Антонюк В.О. Кількісні та якісні зміни хітину на різних стадіях вегетації грибів-базидіоміцетів. V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" 14 квітня 2023 р. Харків, с. 119-120. (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)

Панчак Л.В., Корабель І.М., Врубель О.Р., Антонюк В.О. Дослідження водорозчинних полісахаридів плодових тіл *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Cui, зібраних на різних стадіях їх розвитку. VII Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" 11 квітня 2025 р. Харків: НФаУ, с. 170-

172. *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)*

Корабель І.М., Антонюк В.О. Комплексне використання надземної частини *Amaranthus caudatus*. X Міжнародна науково-практична конференція "Science of post-industrial society: globalization and transformation processes" 06 березня 2026 р. Вінниця, Україна - Відень, Австрія. с. 875-876. *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку)*

Патенти на корисну модель

Корабель І.М., Салабай С.І., Антонюк В.О. Спосіб одержання екстракту з рослинної сировини з підвищеним вмістом флавоноїдів. / Патент України на корисну модель. № 126361, опубл. 11.06.2018, бюл. №11, 3 с. Додаток В *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку)*

Корабель Іван Михайлович, Панчак Лідія Володимирівна, Антонюк Володимир Олександрович. Спосіб комплексного одержання біологічно активних речовин з насіння щириці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) / Патент України на корисну модель №148769, опубл. 15.09.2021, бюл. № 37, 5 с. Додаток Г *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку)*

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Phytochemical Society of Europe Meeting 2022 (Jasi, Romania, 19-22 September 2022) – публікація тез.

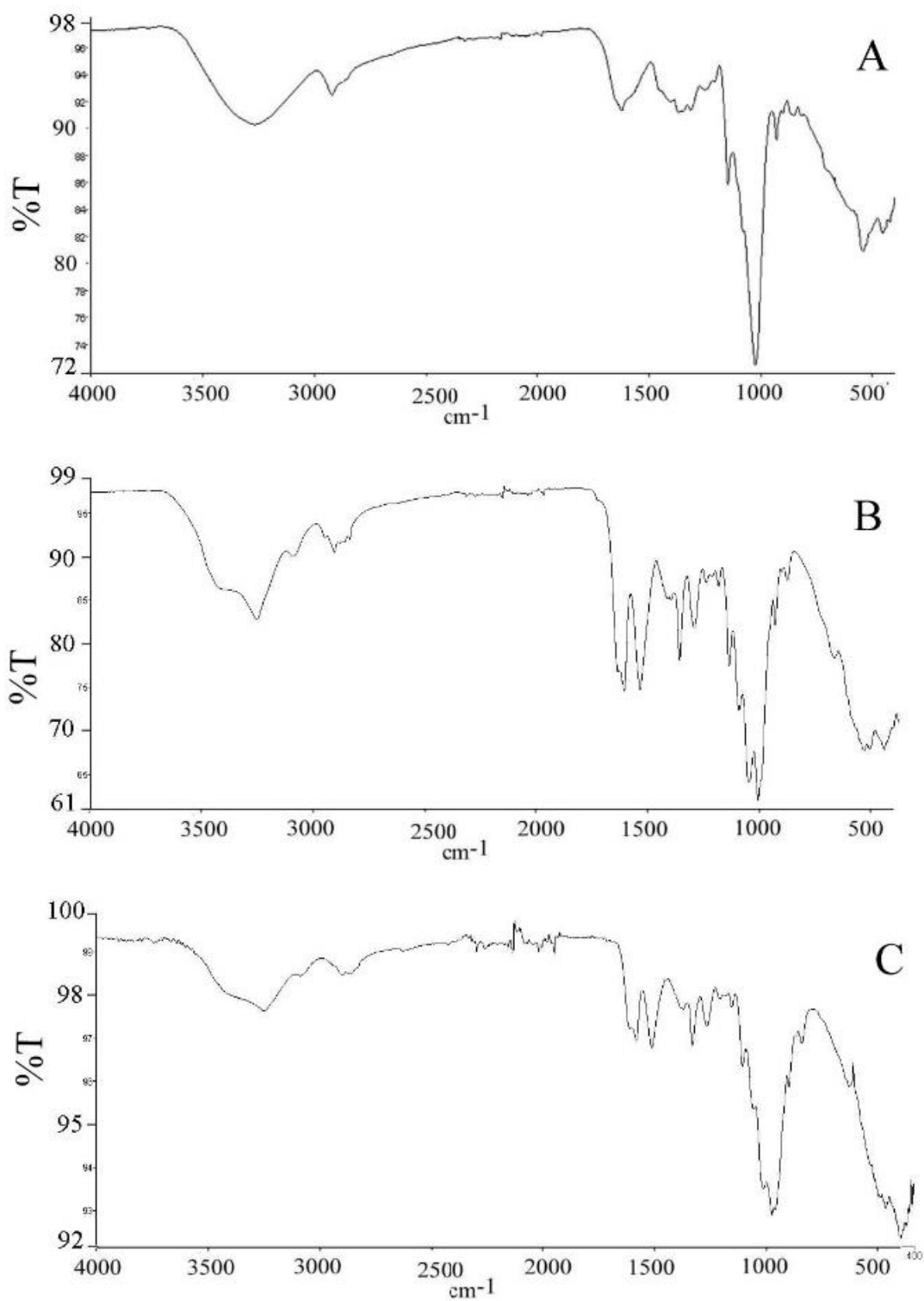
V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" (р. (Харків, 14 квітня 2023 р.) – публікація тез.

VII Міжнародна науково-практична інтернет-конференція "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження". (Харків, 11 квітня 2025 р.) – публікація тез.

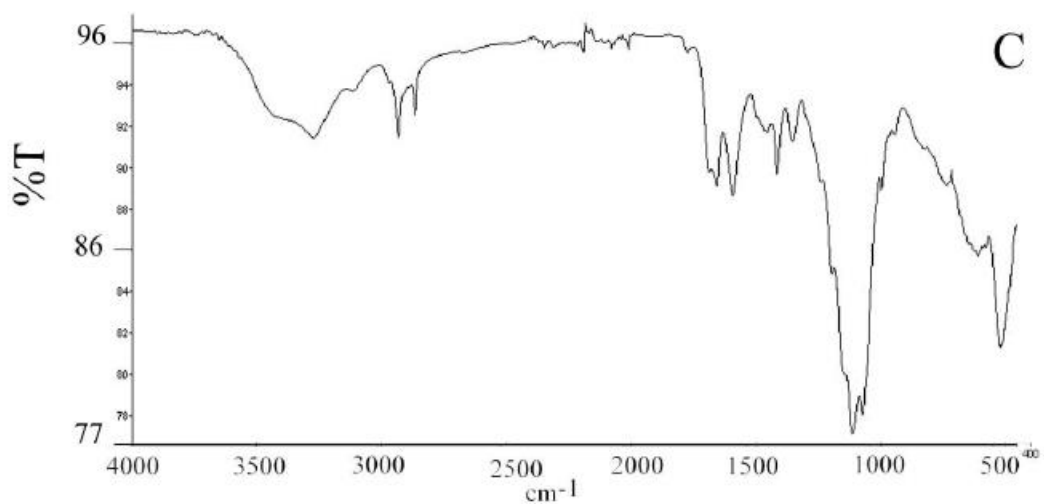
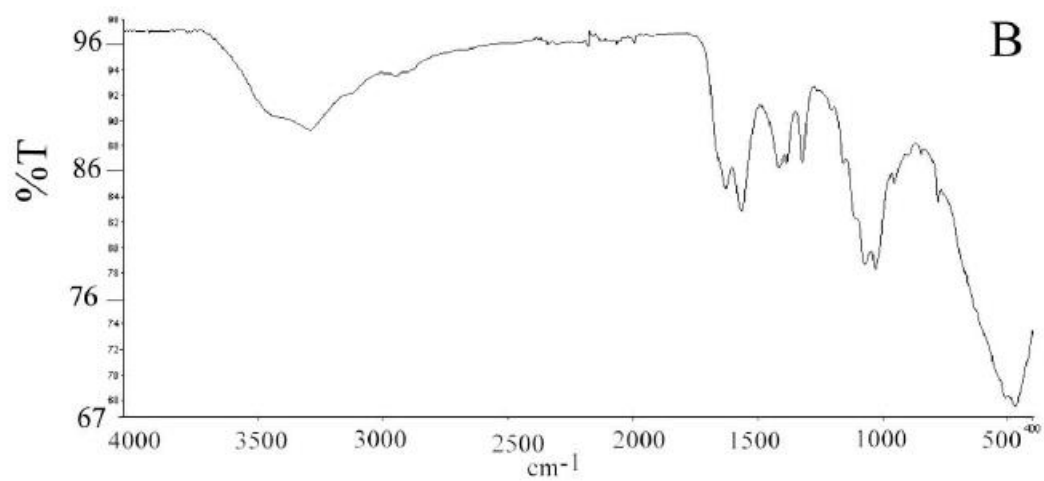
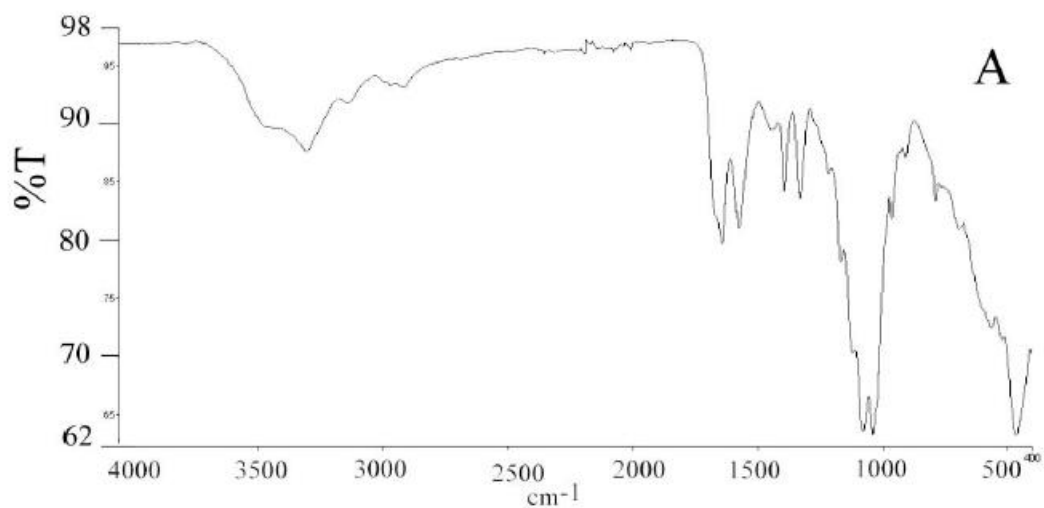
X Міжнародна науково-практична конференція "SCIENCE OF POST-INDUSTRIAL SOCIETY: GLOBALIZATION AND TRANSFORMATION PROCESSES" (Вінниця 06 березня 2026) – публікація тез.



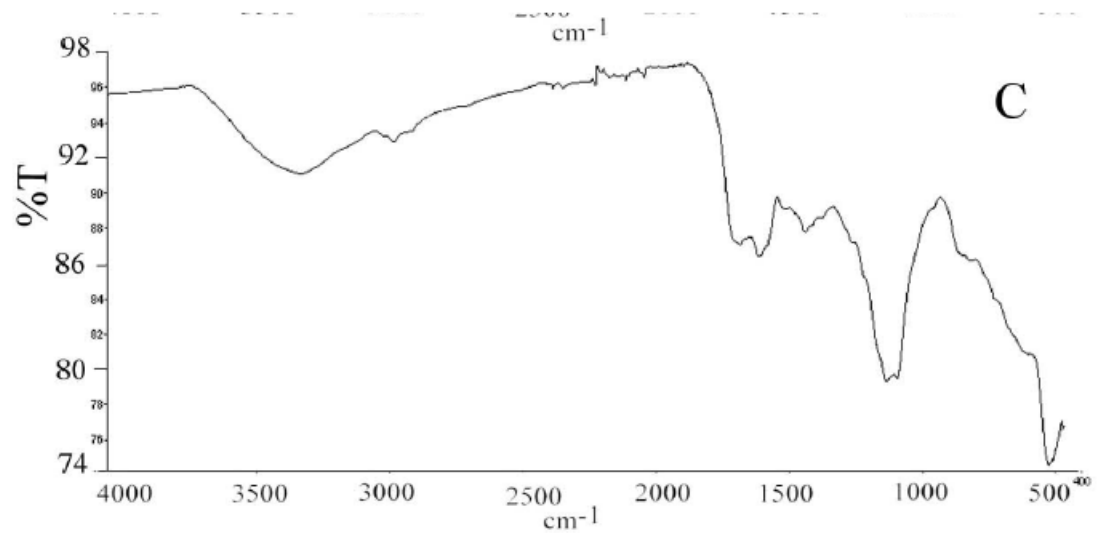
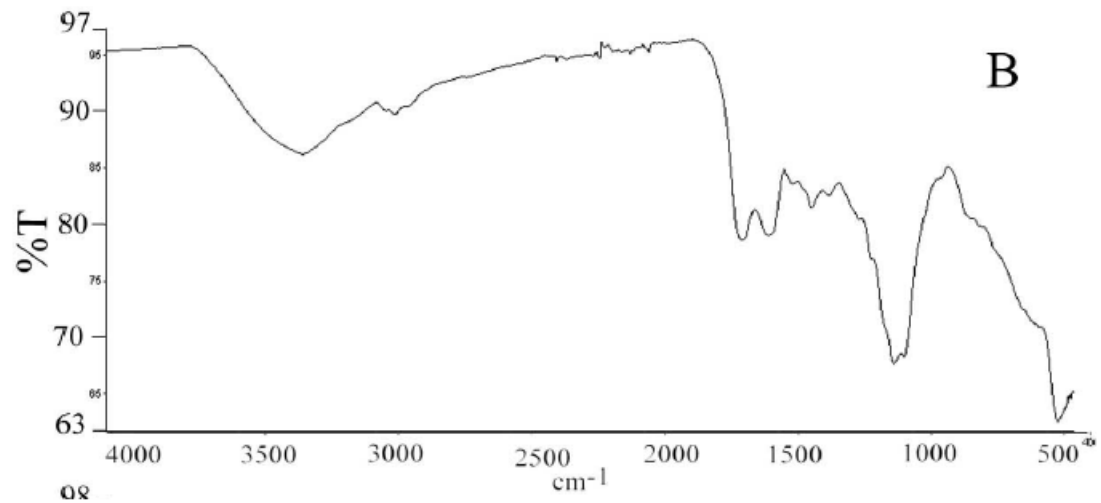
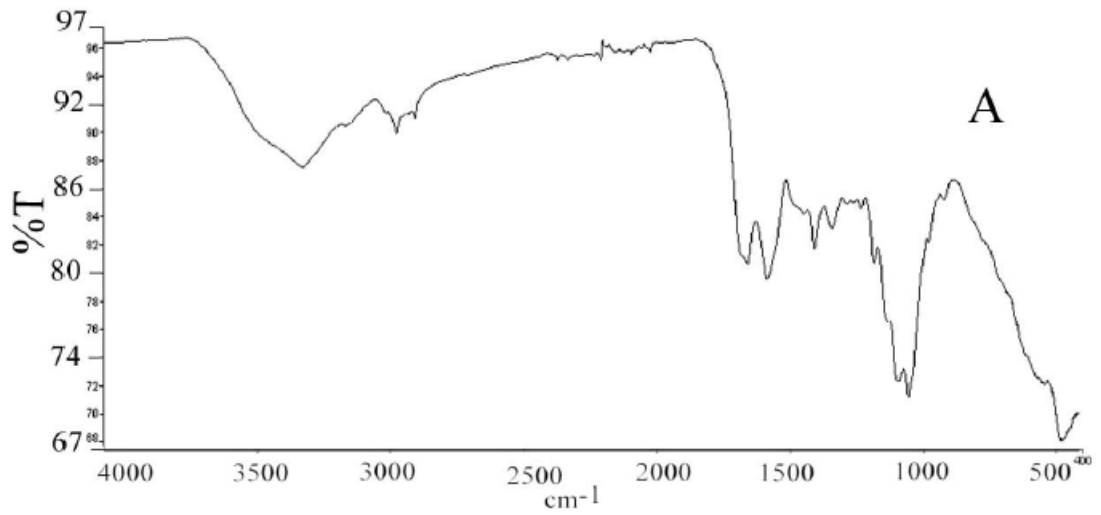




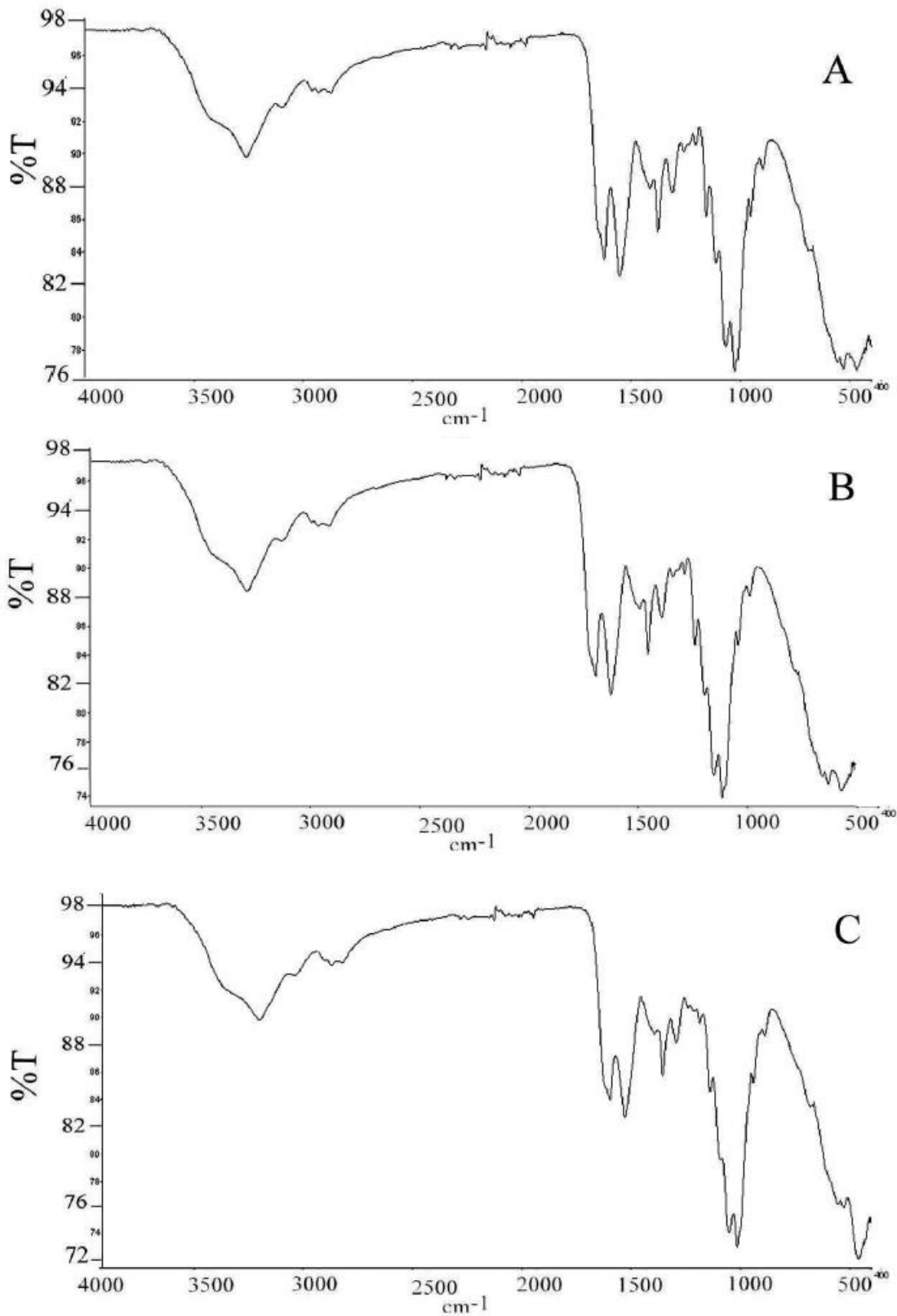
Інфрачервоні спектри хітину, отриманого з плодових тіл молодого (A), зрілого (B) та перезрілого (C) *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill.



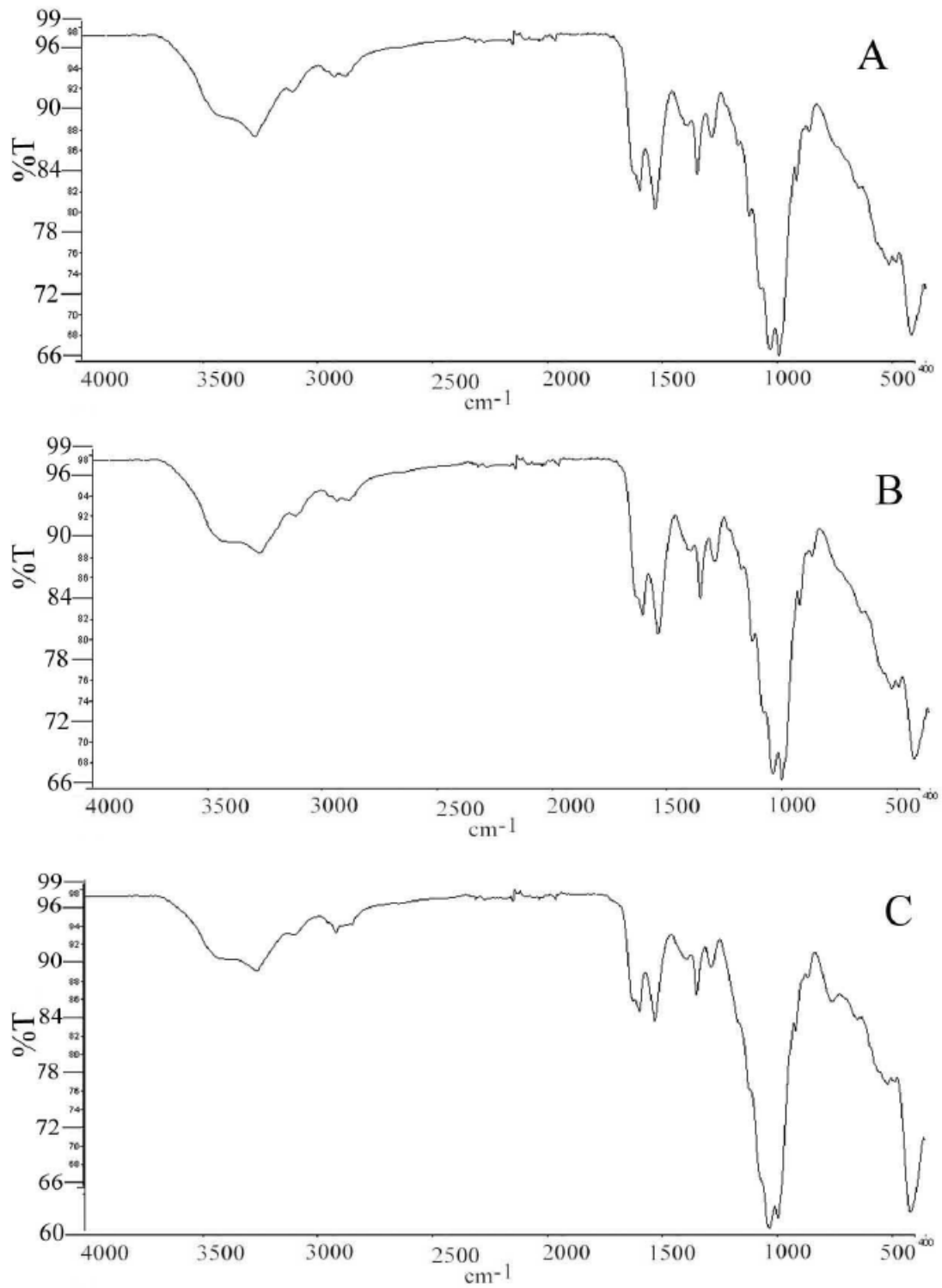
Інфрачервоні спектри хітину, отриманого з плодових тіл молоді (А), зрілої (В) та перезрілої (С) *Fomitopsis betulina* (Bull.) В.К. Суй.



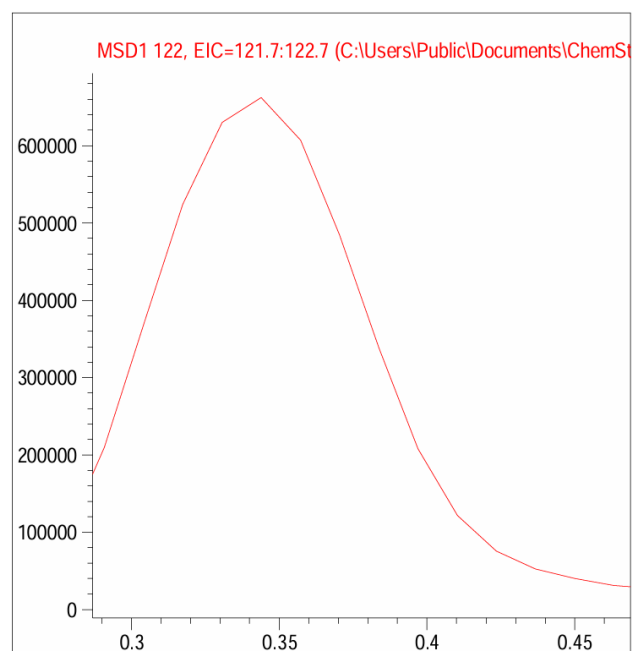
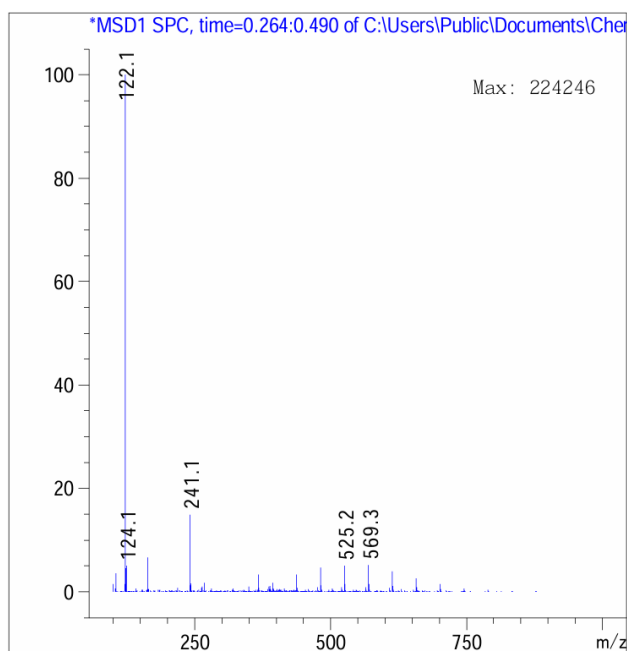
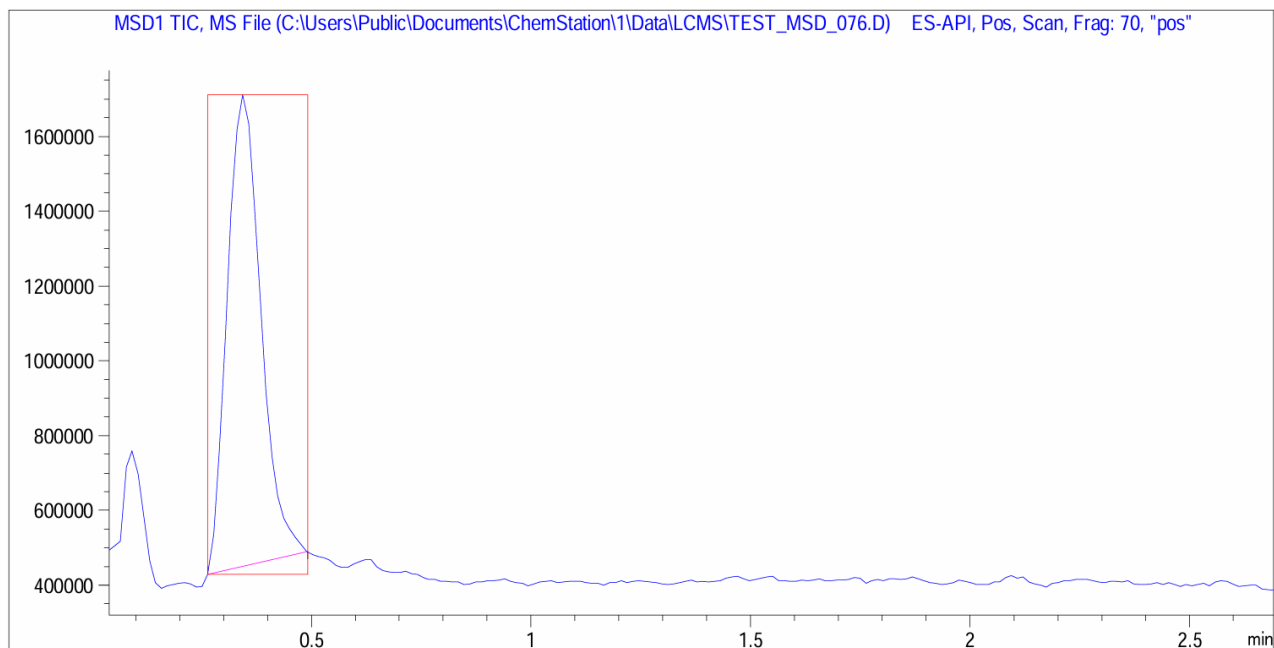
Інфрачервоні спектри хітину, отриманого з плодових тіл молодого (A), зрілого (B) та перезрілого (C) *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst.



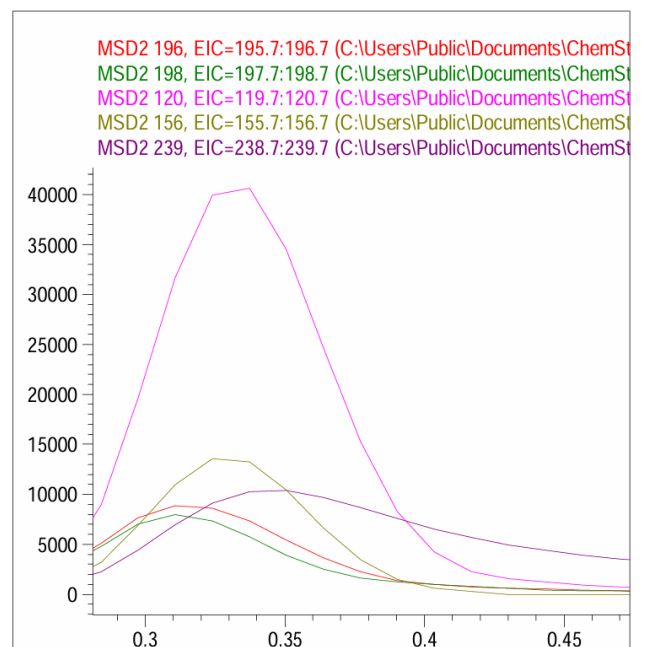
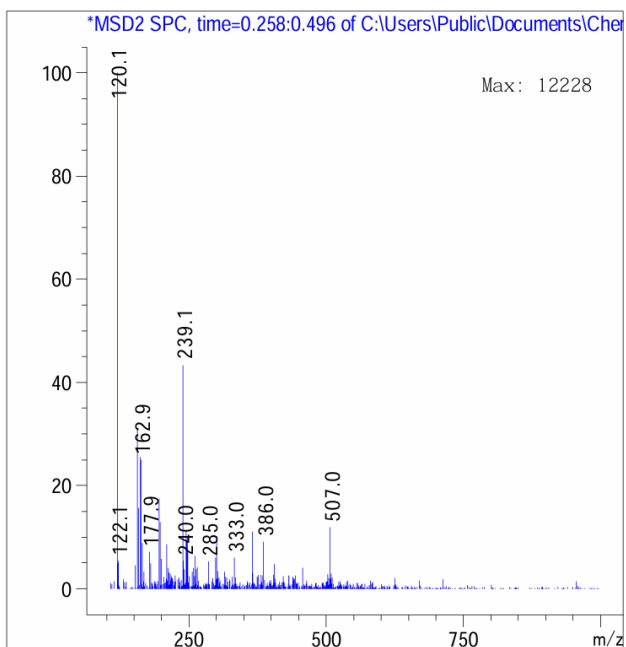
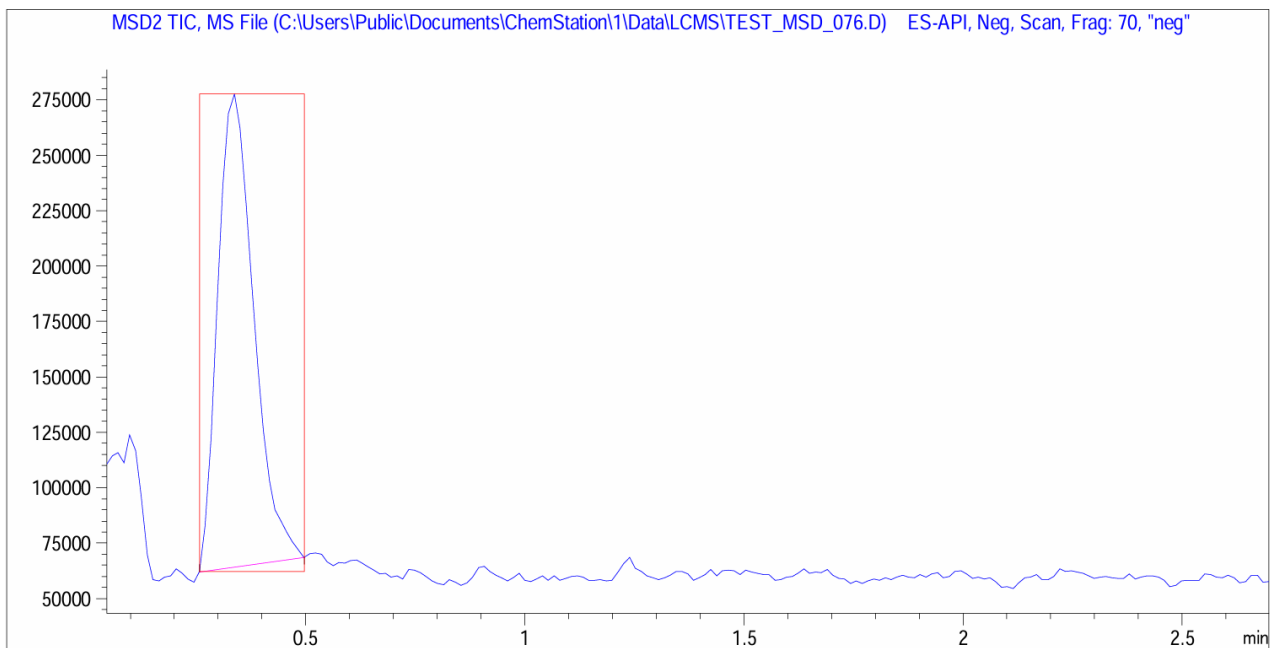
Інфрачервоні спектри хітину, отриманого з плодових тіл молодого (A), зрілого (B) та перезрілого (C) *Lycoperdon perlatum* Pers.



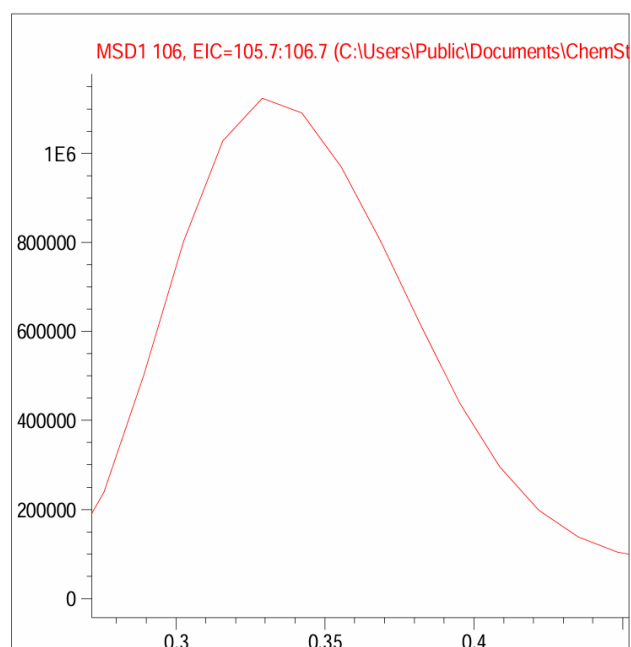
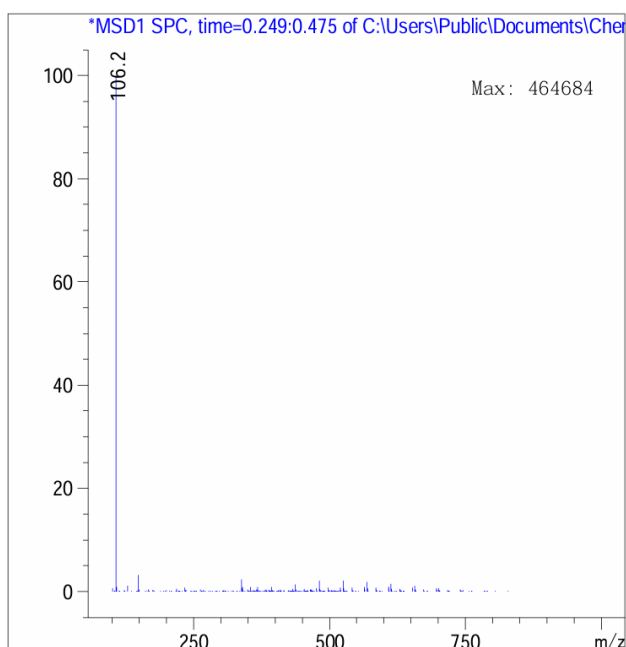
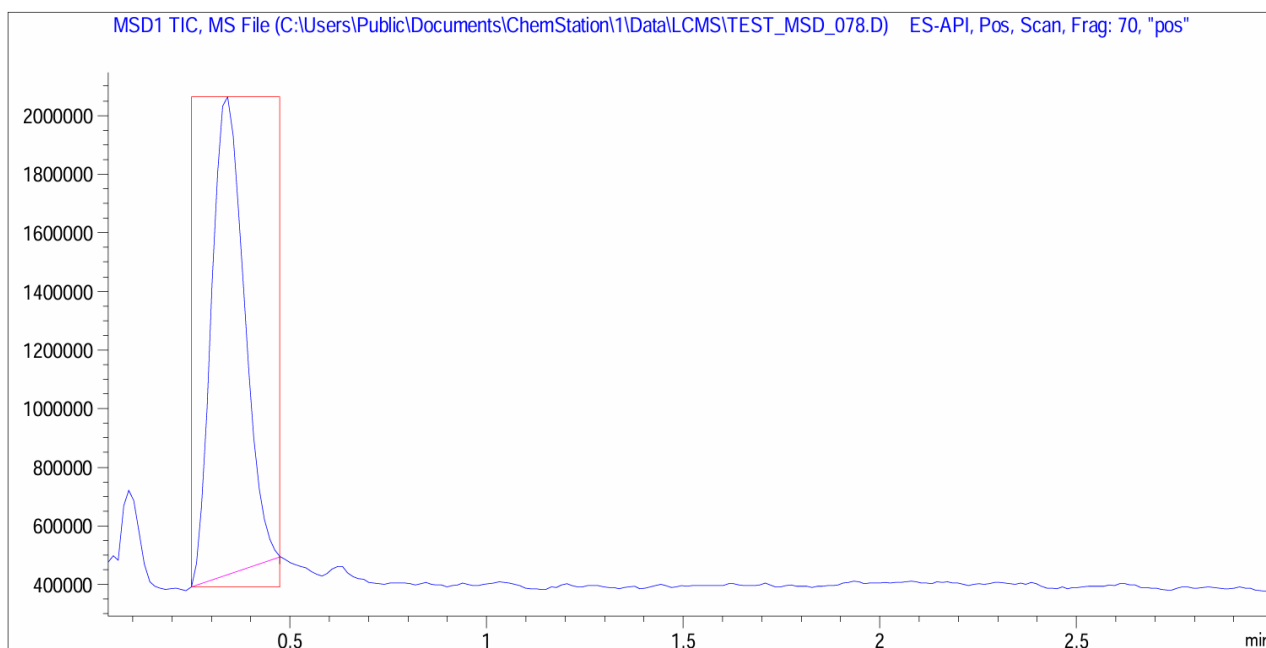
Інфрачервоні спектри хітину, отриманого з плодових тіл молоді (A), зрілої (B) та перезрілої (C) *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat.



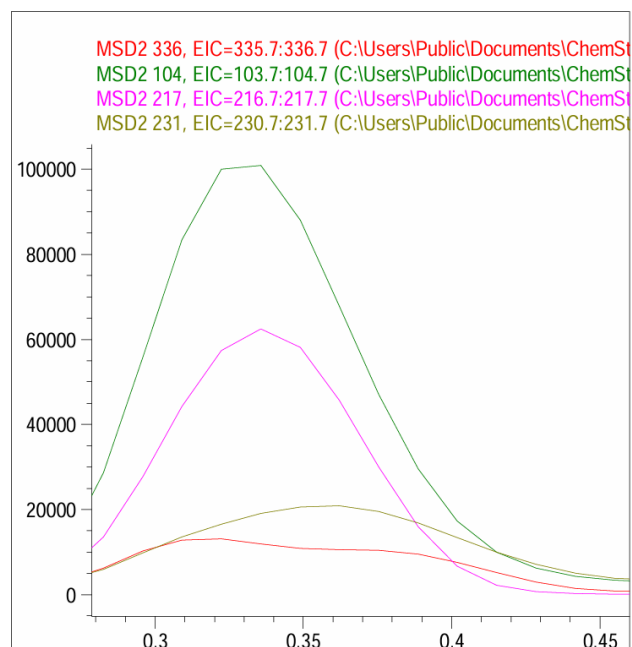
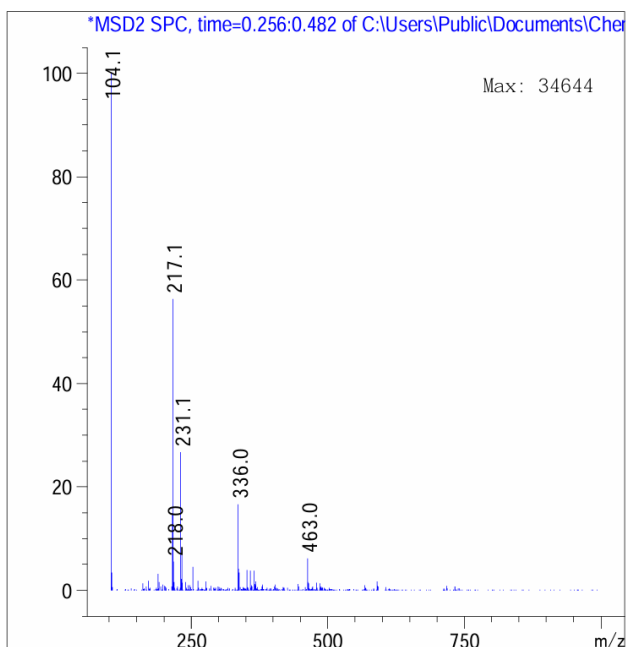
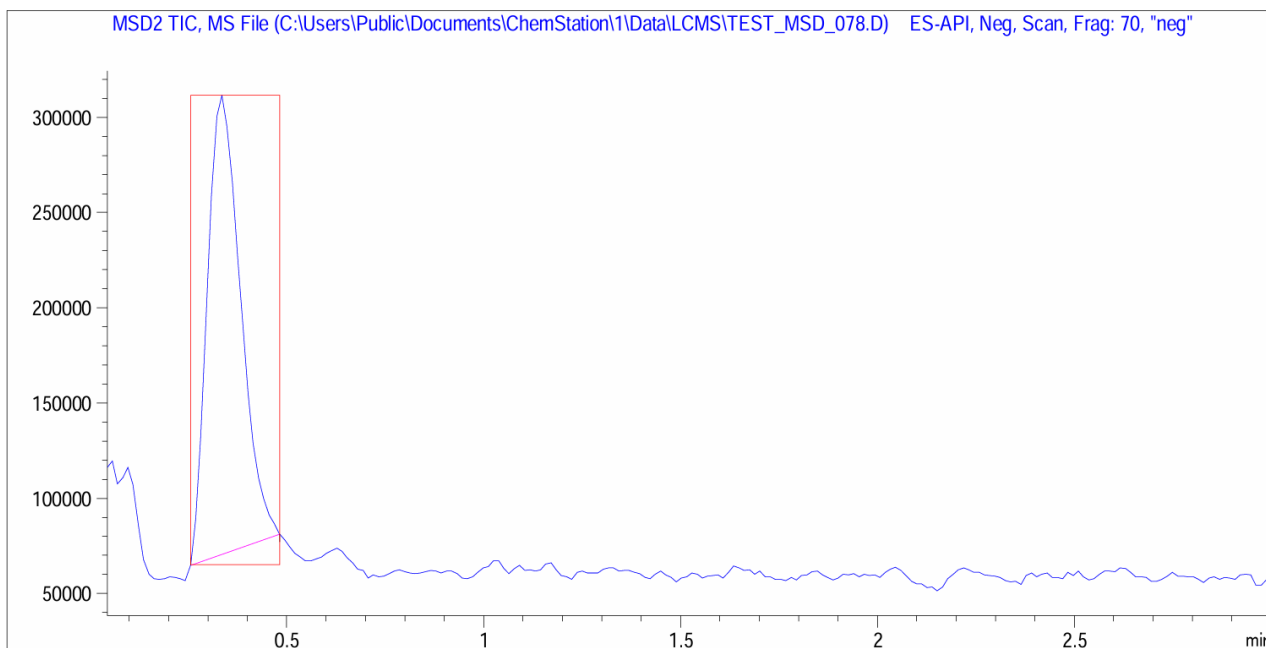
HPLC-MS спектр (позитив) елюйованої плями з ТШХ *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill навпроти амінокислоти-свідка цистеїн (М.м. 121,16)



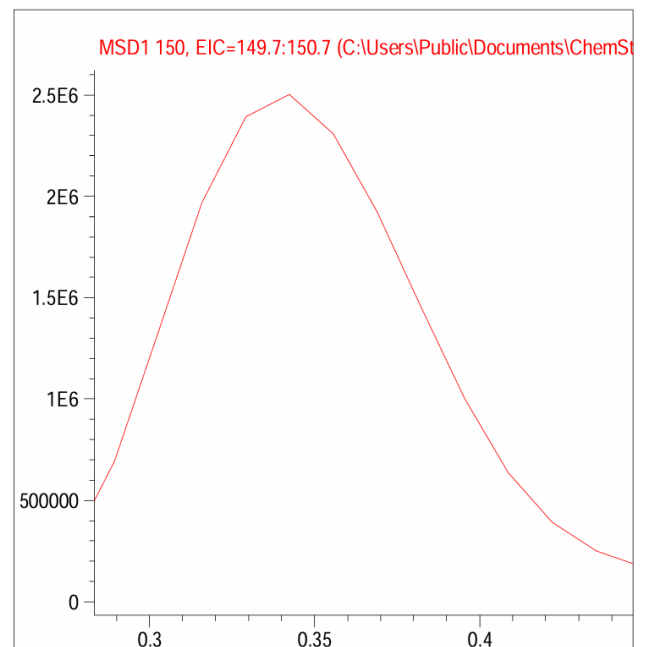
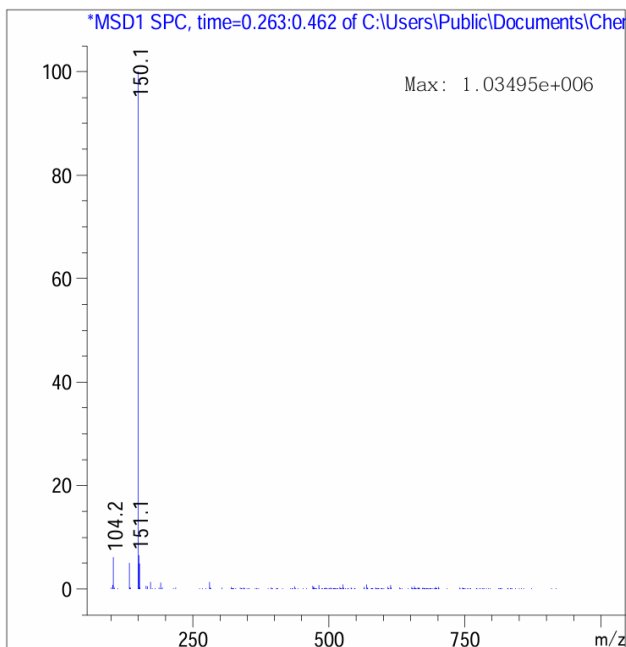
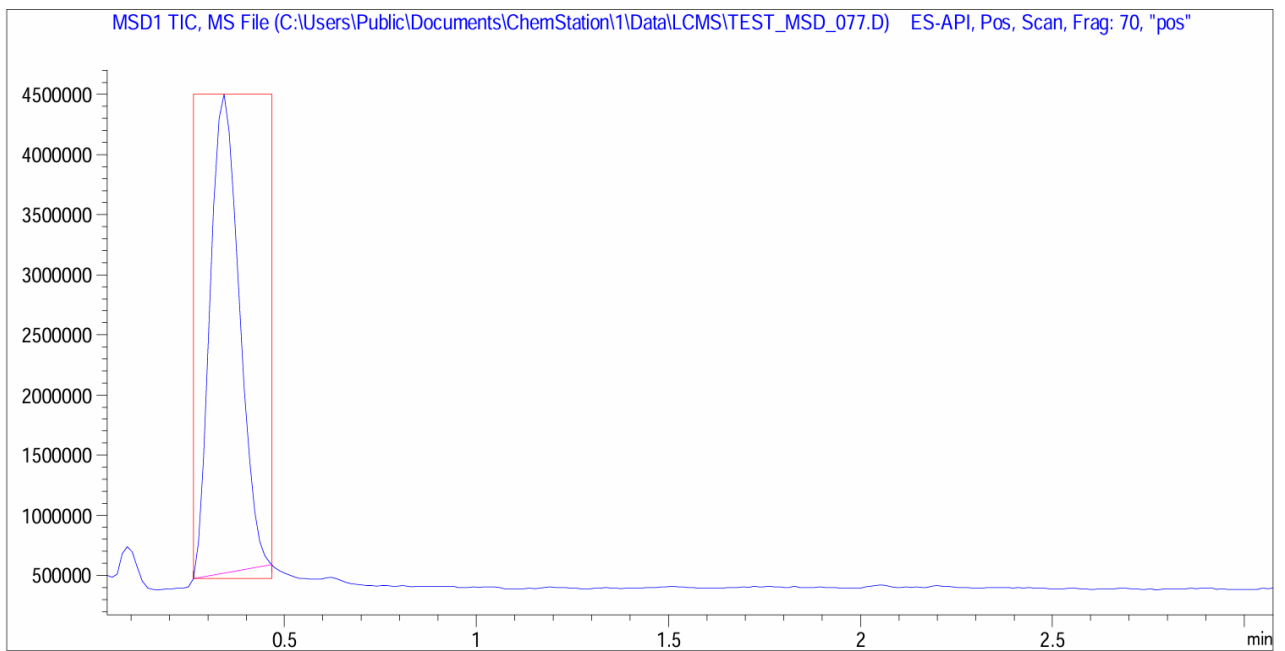
HPLC-MS спектр (негатив) елюйованої плями з ТШХ *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill навпроти амінокислоти-свідка цистеїн (М.м. 121,16)



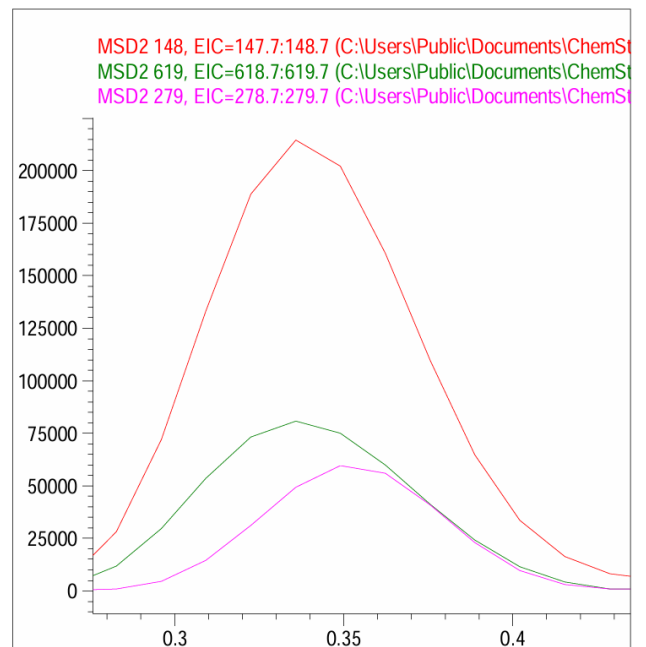
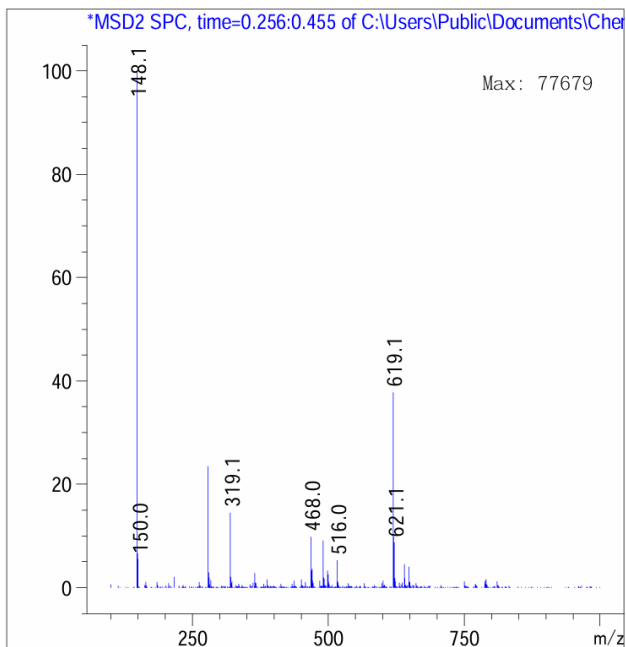
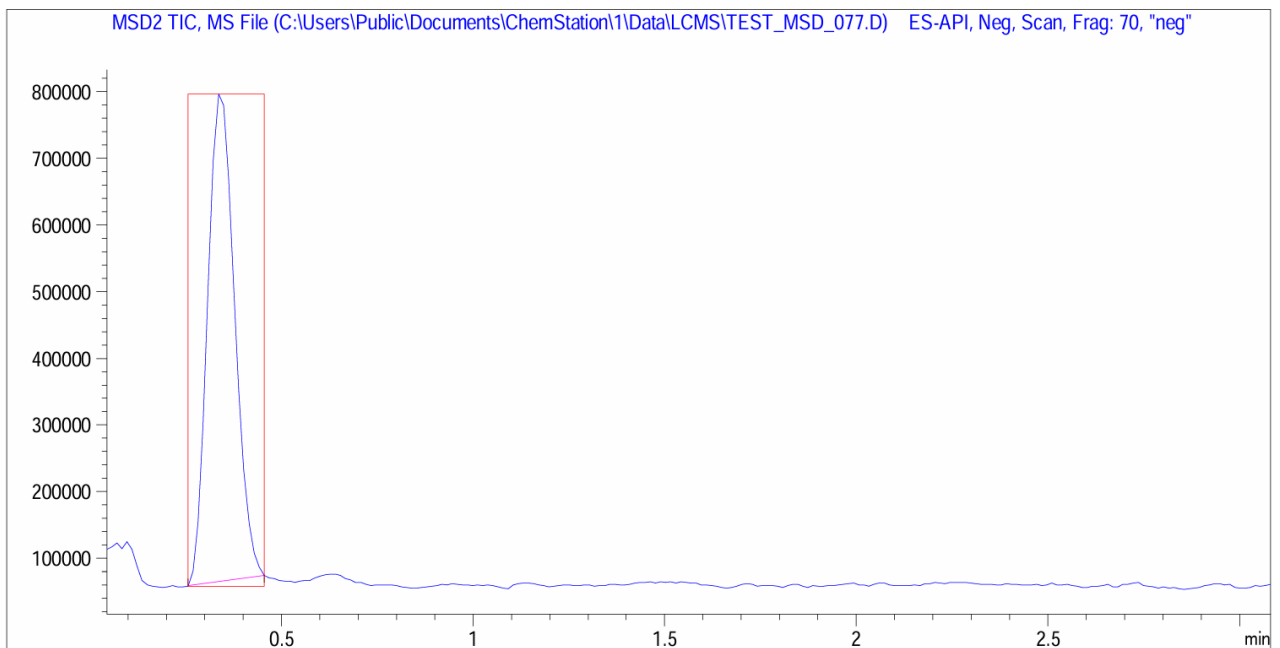
HPLC-MS спектр (позитив) елюйованої плями з ТШХ *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill навпроти амінокислоти-свідка серин (М.м. 105,09)



HPLC-MS спектр (негатив) елюйованої плями з ТШХ *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill навпроти амінокислоти-свідка серин (М.м. 105,09)



HPLC-MS спектр (позитив) елюйованої плями з ТШХ *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill навпроти амінокислоти-свідка метіонін (М.м. 149,9)



HPLC-MS спектр (негатив) елюйованої плями з ТШХ *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill навпроти амінокислоти-свідка метіонін (М.м. 149,9)