

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

06.10 – МР. 216 “С” 2023.02.15. 25 ПЗ

**ПЕТРУСЕНКО ЮЛІЯ ЮРІЇВНА**

**2023 р.**

НУБІП України

НУБІП України

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

УДК 606.620.925:58

# НУБІП України

**ПОГОДЖЕНО**  
Декан факультету  
захисту рослин, біотехнологій та  
екології

(назва факультету (ННІ))

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Завідувач кафедри  
фізіології, біохімії рослин та  
біоенергетики

(назва кафедри)

Коломієць Ю.В. Прилуцька С.В.  
(підпис) (ПІБ) (підпис) (ПІБ)  
“ ” 2023 р. “ ” 2023 р.

# МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА на тему «Біоконверсія відходів грибами роду *Agaricus L.*»

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

Освітня програма “Екологічна біотехнологія та біоенергетика”  
(назва)

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

**Гарант освітньої програми**

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

Лісовий М.М.  
(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи  
доктор біологічних наук, доцент  
(науковий ступінь та вчене звання)

Бойко Ф.А.  
(ПІБ)

Виконала

(підпис)

Петрусенко Ю.Ю.

(ПІБ студента)

# НУБІП України

Київ – 2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри фізіології, біохімії  
рослин та біоенергетики  
доктор біологічних наук Прилуцька С.В.  
(науковий ступінь, вчене звання) (підпис) (ПІБ)  
“ ” 2023 року

ЗАВДАННЯ  
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ  
СТУДЕНТУ

Петрусунко Юлії Юріївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Біоконверсія відходів грибами роду *Agaricus* L.»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “15” лютого 2023 р. № 216

Термін подання завершеної роботи на кафедру 31.10.2023

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи живильні речовини компосту і врожайність *Agaricus bisporus* на органічних субстратах.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Проаналізувати здатність їстівних грибів до біоконверсії відходів та продукування, при цьому, максимального кількості плодових тіл або міцелію.
2. Провести хімічний і мікробіологічний аналіз субстратних композицій.
3. Встановити позитивний ефект використання прийому попередньої ферментації субстрату для подальшої утилізації поживних речовин міцелієм *Agaricus bisporus*.

Дата видачі завдання “ 1 ” жовтня 2022 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Бойко О.А.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

Петрусунко Ю.Ю.

(підпис)

(прізвище та ініціали студента)

# РЕФЕРАТ

# НУБІП України

Магістерська робота виконана обсягом 42 сторінок формату А4, яка містить 4 таблиці, 6 рисунків та 55 літературних джерела.

**Актуальність теми.** В увсьому світі в умовах швидкого зростання чисельності населення проблема дефіциту та якості білкових продуктів продовжує залишатись актуальною. Традиційне сільськогосподарське виробництво білка у вигляді продукції рослинництва, тваринництва та птахівництва не справляється з потребами сучасного суспільства на повноцінному харчуванні. За даними ФАО/ВООЗ населення багатьох країн різною мірою потребує додаткових джерел білка. Нестача білка в харчуванні є одним з основних факторів зниження середньої тривалості життя і вкрай необхідний дітям для розумового та фізичного розвитку. Відомо що харчова промисловість потребує нових функціональних та профілактичних продуктах харчування, у тому числі з грибів, які при регулярному застосуванні можуть надавати оздоровчу дію на організм людини.

**Метою нашої роботи** є підвищення ефективності конверсії живильних речовин компосту і врожайності *Agaricus bisporus* на органічних субстратах.

Для вирішення даної мети потрібно виконати наступні завдання:

1. Проаналізувати здатність істівних грибів до біоконверсії відходів та продукування, при цьому, максимального кількості плодових тіл або міцелію;
2. Провести хімічний і мікробіологічний аналіз субстратних композицій;
3. Встановити позитивний ефект використання прийому попередньої ферментації субстрату для подальшої утилізації поживних речовин міцелієм *Agaricus bisporus*.

**Об'єкт дослідження** – живильні речовини компосту.

**Предмет дослідження** – ріст і розвиток плодових тіл *Agaricus bisporus*.

# НУБІП України

# ЗМІСТ

## ВСТУП 7

## РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 8

1.1. Макроміцети у біоконверсії відходів агроіндустрії та забезпечення харчової безпеки. 9

1.2. Базидієві гриби як засоби переробки та утилізації лігноцелюлозних відходів. 10

1.3. Грибна індустрія 15

1.4. Методи культивування міцелію та плодових тіл вищих базидіоміцетів 17

1.5. Таксонометрія, морфологія та біологічно активні сполуки грибів *Armillaria mellea*, *Lenzula edodes* та *Grifola frondosa*. 20

1.6. Вплив абіотичних факторів на зростання та розвиток бази дієвих грибів. 23

**РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 29**

2.1. Матеріали дослідження 29

2.2. Методика приготування компосту. 29

2.3. Методика визначення вмісту компосту. 29

**РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ 31**

3.1. Хімічний та мікробіологічний аналіз субстратних композицій. 31

**ВИСНОВКИ 38**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 39**

НУБІП України

НУБІП України

# НУБІП України

## ВСТУП

На сьогоднішній день обсяг агропромислових відходів (на всіх стадіях сільськогосподарського виробництва, переробки та споживання) щорічно зростає та досягає величезного рівня. Так, кількість пшеничних висівок складає 650 млн.

т, пшеничного соломки – більше 350 млн. т, рисової соломки – близько 700 млн. т.

Усі види соломки частіше всього піддаються спалюванню, що негативно впливає на навколишнє середовище. Величезна кількість гною сільськогосподарських тварин та пташиного посліду також створюють екологічну проблему. У 152

країнах дослідження, що стосується виробництва продовольства та його втрат, показали, що губиться 47 % коренеплодів, 44% фруктів та овочів, 28% зернових, 23% олійних культур та бобових, 12 % молочних продуктів.

Особлива увага придляється дослідженню вивченню біохімічної діяльності базидієвих грибів, які мають швидкий ріст і здатні утилізувати відходи промисловості, сільськогосподарства, а також продукти їх переробки.

Метою нашої роботи є підвищення ефективності конверсії живильних речовин компосту і врожайності *Agaricus bisporus* на органічних субстратах.

Для вирішення даної мети потрібно виконати наступні завдання:

1. Проаналізувати здатність істівних грибів до біоконверсії відходів та продукування, при цьому, максимального кількості плодових тіл або міцелію;
2. Провести хімічний і мікробіологічний аналіз субстратних композицій;
3. Встановити позитивний ефект використання прийому попередньої ферментації субстрату для подальшої утилізації поживних речовин міцелієм *Agaricus bisporus*.

# НУБІП України

# НУБІП України

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Макроміцети у біоконверсії відходів агроіндустрії та забезпечення харчової безпеки.

Забруднення навколишнього середовища, збіднення лісових угідь, масова вирубка лісів призвели до того, що населення міст все менше використовує дикорослі їстівні гриби для харчових цілей. Крім того, у всьому світі в умовах швидкого зростання чисельності населення проблема дефіциту та якості білкових продуктів продовжує залишатись актуальною. Традиційне сільськогосподарське виробництво білка у вигляді продукції рослинництва, тваринництва та птахівництва не справляється з потребами сучасного суспільства на повноцінному харчуванні. За даними FAO/WHO населення багатьох країн різною мірою потребує додаткових джерел білка. Нестача білка в харчуванні є одним з основних факторів зниження середньої тривалості життя і вкрай необхідний дітям для розумового та фізичного розвитку. Відомо що харчова промисловість потребує нових функціональних та профілактичних продуктах харчування, у тому числі з грибів, які при регулярному застосуванні можуть надавати оздоровчу дію на організм людини.

В даний час світові обсяги відходів виробництв сільського та лісового господарств становлять найбільшу групу щорічно поновлюваного рослинної сировини – 2,5 та 3,2 млрд. тонн, відповідно.

Серед альтернативних методів отримання білка та біологічно активних речовин особливо перспективними є виробництво міцелію та плодових тіл ксилотрофних видів грибів, за умов регульованого мікроклімату. В цих методи особливого значення надаються оптимізації умов культивування з використанням абіотичних факторів та ендогенних регуляторів зростання.

В Україні її широко застосовують у їжу переважно печериці (*Agaricus bisporus*) та гливи (*Pleurotus ostreatus*), технології вирощування яких постійно удосконалюються. Водночас у багатьох країнах світу проводяться активні дослідження з культивування тих видів грибів, які широко використовувалися у

народній медицині. Проте їхнє культивування ускладнюється дефіцитом сировини та проблемами біобезпеки через алергічну дію спор грибів.

Серед активно культивованих грибів до найбільш перспективних, безумовно, відносять і лікарські види базидіоміцетів, таких як шиї таке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) (світове виробництво 700 тис. на рік) та майтаку (*Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) Gray) (125 тис. тонн на рік), що поєднують у собі високу швидкість росту, біологічну активність та відсутність токсикантів, будучи сировиною отримання лікарських препаратів. Культивування цих видів грибів у промислових масштабах здійснюється в основному в країнах Південно-Східної Азії, Європи та Америки на місцевій лігноцелюлозній сировині (деревина бука, дуба, клена, рисове лушпиння, солома та ін).

Найбільший інтерес становлять гриби, виробництво яких у світі знаходиться на лідируючих позиціях. Представники *Agaricales* (Агарикові), серед яких і самий вирощуваний у світі гриб *Agaricus bisporus* (печерниця двоспорова), виявляють здатність до біоконверсії різних відходів (табл. 1.1.)

Таблиця 1.1

Біоконверсія агропромислових відходів грибами *Agaricales*

Вид гриба	Вид відходів	Максимальний ефект
<i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach	солома маща; кормові боби; буряковий жом	солома маща (УР = 2,56 кг/10 кг), солома маща + кормові боби = 3:1 (УР = 2,51 кг/10 кг)
	рисова солома; рисові висівки; курячий гній	*
	кокосове волокно; гній; тирсу; вермікомност; пісок	кокосове волокно + вермікомност + навоз + опилки + пісок (1:1:1:1)
<i>Agaricus bitorquis</i> (Quel.) Sacc	рисова солома; рисові висівки; курячий гній	*
<i>Agaricus flocculosipes</i> R.L. Zhao, Desjardin, J. Guinbertau & K.D. Hyde	пшенична солома + кінський гній	УР = 1,04 г/кг



*Agaricus subrufescens*

пшенична солома +

УР = 83,90 г/кг

Реск

кінський гній

\* Констатація факту культивування без порівняння результатів

Невибагливі з погляду споживаного субстрату для культивування

представники *Pleurotaceae* (Плевротові), чим пояснюється широке використання в

переважній більшості своїх істівних грибів цієї родини для біоконверсії агропромислових відходів.

У трійці лідерів з вирощування грибів у світі та популярний істівний гриб *Lentinula edodes*. Ряд авторів визначали здатність цього гриба та його найближчих «родичів» утилізувати відходи агропромислового комплексу.

Як зазначалося вище, важливо не лише утилізувати відходи, але й одночасно отримати високопротеїнові та багаті біологічно активними речовинами (БАВ) харчові ресурси плодові тіла та міцелій грибів.

Тому, не залишилися поза увагою істівні гриби з родин *Agrocybe*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Hypsizygus*, *Morchella*, *Lyophyllum*, *Oudemansiella*, *Pholiota*, *Volvariella*. З біотехнологічної точки зору, інтерес дослідників був зосереджений, перш за все, на БЕ та врожайності.

Варто зазначити, що деякі відходи та продукти, які не є агропромисловими відходами, згадуються у таблицях і тексті, якщо вони служать компонентом субстрату чи контролем у дослідженнях.

Три види харчових відходів (горіх, боби, м'якоть буряків) були використані в різних співвідношеннях з соломою маша для їх утилізації грибом *A. bisporus*.

Урожай на соломі маша 2,56 кг/10 кг, соломі маша з бобами у співвідношенні 3:1 – 2,51 кг/10 кг [17].

Оцінено доцільність додавання шкірки цитрусових (помело, лимон, апельсин та грейпфрут) для інтенсифікації біологічно активних метаболітів при культивуванні в зануреній культурі *A. sinnamomea*. За винятком грейпфрута, екстракти шкірки цитрусових виявилися корисними для зростання міцелію та синтезу внутрішньоклітинного полісахариду. Найбільш ефективним для підвищення вмісту біологічно активних метаболітів став екстракт лимонної шкірки. З додаванням 2% цього екстракту концентрація біомаси та

внутрішньоклітинного полісахариду зростає з 11,96 г/л і 123,6 мг/г (у контролі) до 21,96 г/л та 230,8 мг/г (на 8-й день). Синтез тритерпеноїдів також збільшився з 86,7 мг/л (у контролі) до 282,9 мг/л.

## 1.2. Базидієві гриби як засоби переробки та утилізації лігноцелюлозних відходів.

Деревні та трав'янисті рослини є основними джерелами субстратів для культивування базидієвих грибів. В світі існують величезні, щорічно відновлювані види лігноцелюлозного сировини. Це в основному відходи деревопереробної промисловості та сільськогосподарського виробництва, що йдуть у відвали або спалюються, що призводить до забруднення довкілля. Найбільш поширені та доступні ресурси представлені у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2.

Сировина для культивування їстівних та лікарських грибів, використовується як субстрат

№	Джерело сировини	Матеріал
1	Деревопереробна промисловість	Деревина листяних порід дерев: тополя, вільха, береза, осика, липа, в'яз.
2	Сільськогосподарське виробництво	Обріз плодових культур. Солома зернових культур: пшениця, жито, овес, ячмінь, просо. Відходи переробки зерна: висівки, підлога, лущиння, макуха. Кукурудзяні качан, стебла, листя технічних культур, багаторічних, однорічних трав.
3	Парфумерна та медична промисловість	Відходи екстракції ефірнолійних культур
4	Текстильна промисловість	Відходи переробки бавовни: очеси, горішок, чаду, підмети, багаття дьону
5	Пивоварне виробництво	Пивна дробина, солодові паростки

Сировина, що містить велику кількість лігніну та целюлози та невелика кількість легкозасвоєваних сполук вуглецю (квохмаль, цукру) та азоту (білки, амінокислоти), використовується як основа субстрату. Це переважно вегетативні частини рослин.

Сировина, багата на легкозасвоєвані сполуками вуглецю та азоту, що містить низький рівень лігніну та целюлози, використовують як живильну білкову або білково-жирову добавки. Це зазвичай генеративні частини рослин.

Культивування базидієвих грибів на лігноцелюлозній сировині гарантує ефективну утилізацію відходів, що забруднюють навколишню середу. Застосування як сировина для культивування їстівних грибів малочінних, місцевих ресурсів (відходів), що поповнюються, дозволяє отримувати цінний, білковий, делікатесний, харчовий продукт (гриби), а перероблений субстрат використовувати як органічне добриво для відкритого та закритого ґрунту (мікодобрива), як субстрат для вермікультури (мікосубстрат) або як поживну добавку в корми сільськогосподарським тваринам (мікоцорм).

Найбільш перспективними продуцентами у процесах біоконверсії рослинної сировини є базидієві гриби, що відносяться до екологічну групу – ксилотрофи. Ці гриби використовують у своєму харчуванні целюлозу та лігнін, що дає можливість вирощувати їх на різних рослинних субстратах, включаючи відходи деревопереробної промисловості та сільськогосподарського виробництва.

Лігноцелюлозна сировина складається переважно з целюлози (30–50%), геміцелюлоз (15–35 %) та лігніну (10–20 %), у менших кількостях містить пектин, білки, екстрактивні речовини та золу. Лігнін (*lignum* – деревина) – складна полімерна аморфна сполука фенольного ряду (похідне ароматичних спиртів), нерозчинне у воді (рис. 1.4).

НУБІП України

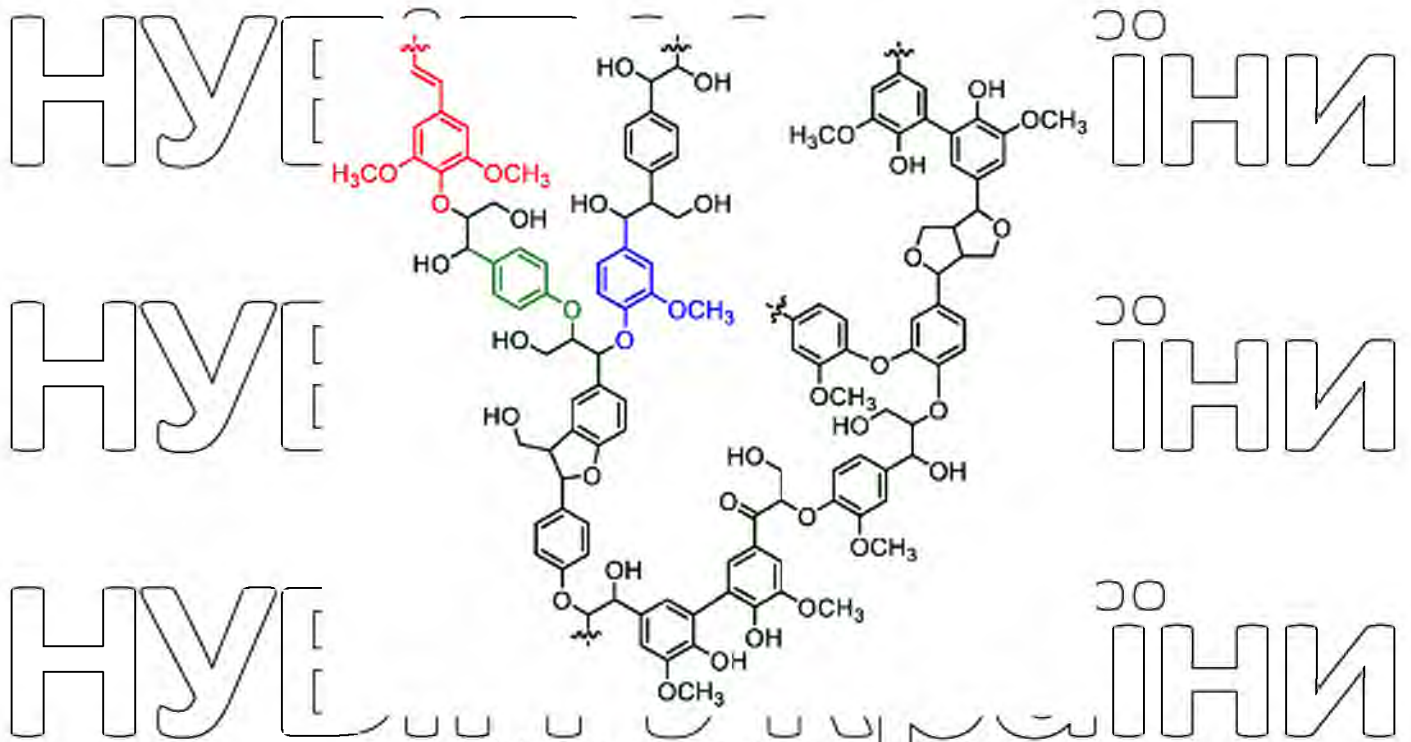


Рис. 1.1. Структурна формула лігніну

За поширеністю серед полімерів деревних клітин він поступається тільки целюлозі. Лігнін збільшує твердість, підвищує жорсткість клітинної оболонки і міститься в клітинах, що виконують опорну функцію. Він розташований у мікроцелюлярних просторах целюлози, а також на її поверхні первинної целюлозної клітинної стінки.

При дії лігнінруйнівних грибів (наприклад, *Panus tigrinus*, *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*) на деревину, біоеструкція лігніну відбувається поступово. Якщо лігнін клітинної стінки не зруйновано то деревина приймає буре забарвлення. При руйнуванні лігніну грибами деревина перетворюється на білу гниль. Ймовірно, що первинна дія при розкладанні лігніну виконують екзоферменти. Як правило, гриби руйнують лігнін, виділяють фенолоксидази, тому вважають, що саме ці ферменти відновідальні за відщеплення ароматичних сполук.

Важливу роль при проникненні гіф через клітинну оболонку грають мікрофібрили. Мікрофібрили, розташовані на поверхні гіф грибів ксилотрофів, представлені екстрацелюлярними волокнами. Їхня довжина становить кілька мкм, а товщина від 200 до 500 А. Мікрофібрили сприяють ензиматичному розкладу клітинної оболонки, тобто проникнення та поширення в неї ферментів. Зростання

гіфів ксилотрофних грибів, як правило, спостерігається в порожнині клітин, а іноді і в пектиновому шарі клітинних оболонок.

Вивчаючи процес біодеструкції лігніну ксилотрофними грибами, вчені встановили такі закономірності: 1) на перших етапах відбувається деметоксилювання та подальше гідроксилювання лігніну, що супроводжується збільшенням кількості гідроксильних груп та зниженням метоксильних; 2) потім відбувається розрив зв'язку  $\alpha$ C- $\beta$ C з окисленням першого гідроксилу до карбонільної групи; 3) надалі спостерігається розрив ароматичного кільця у структурі лігніну.

Здатність базидієвих грибів руйнувати лігнін в даний час стала предметом широких досліджень у біотехнології.

Целюлоза є хімічно гомогенним полімерним вуглеводом, структурною одиницею якого є залишки  $\beta$ -D-глюкози (рис. 1.2).

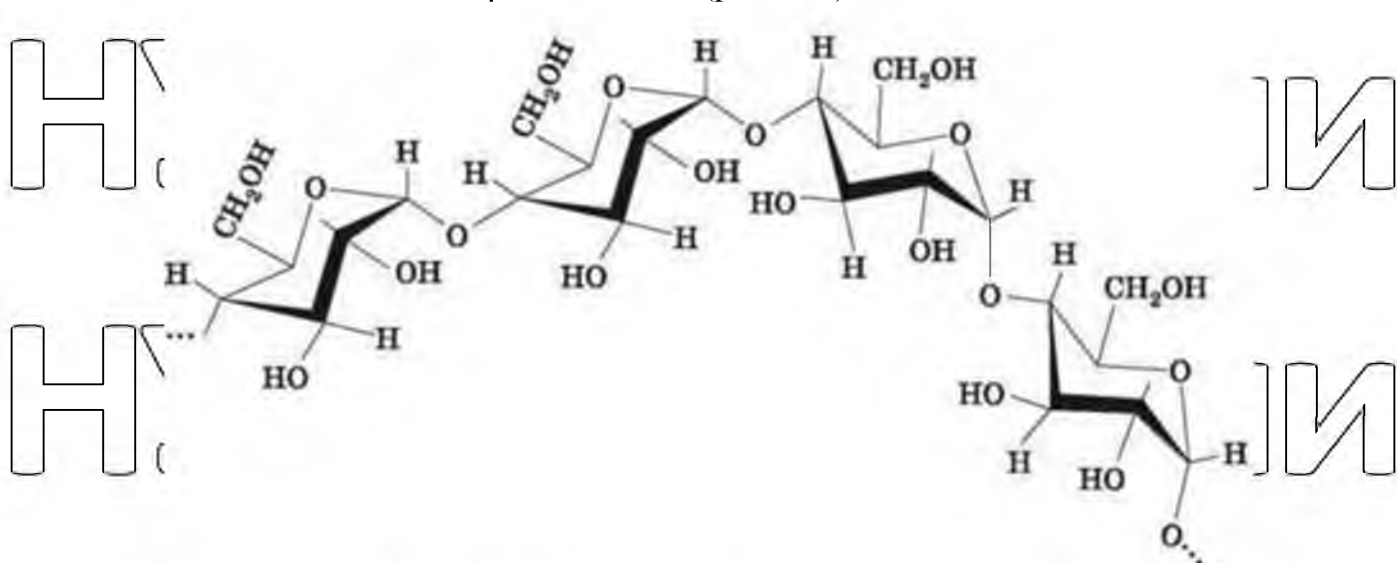


Рис. 1.2. Структурна формула целюлози.

Властивості полімерів частково залежать від типу зв'язку між мономерами; каркасом слугують нерозгалужені або слабо розгалужені ланцюжки, а інші компоненти - зміцнюючими наповнювачами клітинної стінки. Целлобіоз - проміжний продукт інверсії целюлози. Особливістю вихідного стану целюлози є те, що до складу клітинної стінки рослин входять волокна целюлози, що перебувають у комплексі з іншими полісахаридами (геміцелюлозою, пектином).

лігніном, різноманітними розчинними речовинами органічної та мінеральної природи, і навіть водою.

Целюлозоруйнівні гриби або гриби, що викликають буру гниль, піддають деструкції лише целюлозу. Деревина змінює колір від червоною до іржаво-червоної і, зрештою, стає темно-бурою від звільненого лігніну, тендітної, легко кришиться і ламається, помітно втрачає в обсязі та масі, нерідко тріскається.

Деякі гриби впливають одночасно як на лігнін, так і на целюлозу: глива (*Pleurotus ostreatus*), трутовик лакований (*Ganoderma lucidum*), опеньок осінній (*Armillaria mellea*).

Такі гриби, як *Armillaria mellea*, здатні заражати деревину, у якій знаходяться ще живі клітини рослинної тканини, що містять необхідний обсяг запасних речовин [4, 61]. За допомогою екзоферментів гриби переводять субстрат з нерозчинної форми розчинну. Також грибам доступні продукти ензиматичного розщеплення деревини, які є для них джерелом енергії та харчування [61].

Таким чином, деревина є природним оточенням для грибів-ксилотрофів, яка виконує кілька суттєвих функцій. По-перше, деревина виступає як структурна матриця для росту грибів. По-друге, організми, що виростають на деревині, споживають целюлозу, лігнін та інші полісахариди як джерело харчування, руйнуючи їх до легкозасвоюваних цукрів з використанням ферментів.

Тому розробка методів інтенсивного культивування ксилотрофних видів грибів з застосуванням різних активно впливають абіотичних та біотичних факторів зростання (максимально наближених до природних), призведе до інтенсифікації процесів розвитку міцелію та плодових тіл, що, у свою черга, дозволить отримувати додаткові продукти для харчових, фармацевтичних та сільськогосподарських цілей.

### 1.3. Грибна індустрія

Потреба у грибах постійно зростає. У зв'язку з цим виникла необхідність переходу штучного вирощування їстівних грибів на промислову основу. Виробництво грибів, незалежно від кліматичних умов, здійснюється цілий рік. В



умовах сучасних грибовничих комплексів з інтенсивною технологією та обладнанням урожай грибів може досягати 2,5 тис. тонн на рік [22]. На рисунку 1.3 показано схему отримання біомаси грибів та їх продуктів.

Рис. 1.3. Схема отримання біомаси грибів і їх продуктів

В даний час використовують близько 40 видів грибів, з яких промислового масштабу вирощують 10–12 видів – близько 5 млн. т/рік.

Середньодушове споживання культивованих грибів в економічно розвинених країнах (Франція, Німеччина, Японія, Голландія, США) становить від 2 до 4,5 кг. У цей показник становить менше 1 кг на людини [9].

За обсягами виробництва перше місце у світі серед культивованих грибів займає печериця (*Agaricus bisporus*) – 37,6 %, за ним слідує ший таке (*Lentinula edodes*) – 16,8 %, глива (*Pleurotus osterstus*) – 16,2 %, юдине вухо (*Auricularia auricula*) – 8,6 %, опінок зимовий (*Flammulina velutipes*) – 4,7 % та сніжний гриб

(*Tremella fuciformis*) – 3,2%. На інші гриби – грибо-баран (*Grifola frondosa*), гнойовик білий кудлатий (*Coprinus comatus*), опеньок літній (*Kuehneromyces mutabilis*), буковий гриб (*Hygrophorus leucophaeus*), кільцевик (*Stropharia rugoso-*

*annulata*) припадає близько 7%. У країнах Південно-Східної Азії переважає виробництво шийтаке (Японія) і гливи (Тайланд, Китай). Їхнє штучне вирощування сягає 260 тис. тонн на рік

В Індонезії та Бірме культивують трав'яну печерицю (*Volvariella volvacea*), а в Кореї та на Тайвані у штучних умовах вирощують зимовий опеньок (*Flammulina velutipes*). У країнах Північної Америки та Європи першість належить печерицями [22].

З екзотичних видів грибів перераховані вище виробники вирощують тільки *Flammulina velutipes* та *Lentinula edodes*, частка в загальному обсязі виробництва яких становить лише 0,45 і 0,03 %, відповідно.

Розвиток промислового культивування їстівних грибів спричинено декількома факторами:

- Можливість виробництва грибів цілий рік;

НУБІП УКРАЇНИ

- Висока врожайність (до 33 кг з 1 м<sup>2</sup>);  
- для культивування їстівних грибів використовуються відходи сільського господарства та деревообробної промисловості, тобто вирішується проблема залучення у виробництво відходів;

технологію культивування грибів можна повністю механізувати;  
- субстрати після збирання грибів можна використовувати як добрива або білкової добавки на корм худобі;  
- гриби є джерелом білка, біологічно активних речовин, мікроелементів

[122].

НУБІП УКРАЇНИ

В даний час на світовому ринку широко використовуються кілька типів продуктів з грибів у формі: сушених біомаси міцелію та плодових тіл у вигляді таблеток чи капсул; порошку культивованих грибів; концентратів та їх сумішей; сушених комбінованих препаратів із субстратної грибниці; спиртових та водних екстрактів біомаси міцелію та плодових тіл [43].

НУБІП УКРАЇНИ

**1.4. Методи культивування міцелію та плодових тіл вищих базидіоміцетів**

НУБІП УКРАЇНИ

Гриби, які мають активні поліферментні системи, становлять важливу ланку біологічного розкладання органічної речовини у природі [25]. Тому застосування грибів, як біологічних агентів у біоконверсії відходів виробництв (відходи сільськогосподарського виробництва та деревопереробної промисловості), має вирішувати проблему безвідходних технологій та передбачати вивчення біотехнологічних та медико-біологічних проблем [31, 44]. У зв'язку з цим багатобічним біотехнологічним процесом може стати твердофазна ферментація рослинних ресурсів

НУБІП УКРАЇНИ

Твердофазне культивування – це біотехнологічний процес, який протікає в масі подрібненого та вологого твердого субстрату, що має різну форму та розміри частинок. Цей метод культивування призначений для біоконверсії рослинної сировини в цінніші продукти, такі як: плодові тіла, кормові добавки, вторинні ферменти та метаболіти [17,]. Послідовність технологічних операцій при



Отриманні плодових тіл грибів цим методом визначається біологією видів, що культивуються. У загальному їх можна розбити на 6 основних етапів [31]:

- Приготування субстрату (подрібнення, зволоження, термообробка),
- інокуляція (внесення міцелію до субстрату);

- Інкубація (заростання субстрату міцелієм);

- Ініціація плодоутворення;

- плодоутворення;

- Плодоношення.

Різні варіанти технологій одержання плодових тіл грибів розрізняються якісним складом субстрату та способом його приготування.

У субстраті повинні міститися всі доступні поживні речовини для росту грибів: крохмаль, целюлоза, цукру як джерела вуглецю; сечовина, білки як джерело азоту, і навіть мінеральні речовини. За своїм фізичним властивостям

субстрат може бути практично нерозчинним у воді, набухати в ній, приймати гелеподібний стан або навіть частково розчинятися [31, 46].

На сьогоднішній день існує два основних способи приготування субстрату: аеробна ферментація та стерилізація субстрату. Інші відомі технології виробництва грибів займають проміжне положення між переліченими вище способами [19].

Здатність культивованих грибів придушувати зростання конкуруючих мікроорганізмів є основою успішного застосування нестерильної технології. Як правило, це вимагає високих доз внесення посівного міцелію (понад 5,0 % від маси готового субстрату), але при культивуванні *Lentinula edodes* та інших екзотичних видів грибів це ненадійно та економічно не вигідно [8].

Вперше стерилізація субстрату була використана при інтенсивному культивуванні *Pleurotus osteratus*. У 1960-1970 роках на стерильних субстратах почали вирощувати багато інших видів грибів ксилотрофів. Культивування грибів за стерильною технологією призводить до значного збільшення врожайності за рахунок підвищення доступності субстрату через часткового гідролізу його

складових компонентів при термообробці. При цьому доза витрати посівного міцелію зменшується у 3–5 разів [8, 31].

Твердофазне культивування має свої переваги порівняно з глибинним, які пов'язані з малим споживанням енергії (через відсутність механічного перемішування та аерації) та матеріалів (для отримання грибів використовуються відходи сільськогосподарського виробництва та деревопереробної промисловості). Крім того, отримані плодові тіла в порівнянні з міцелієм мають кращий товарний вигляд та органолептичні властивості [18].

Водночас твердофазне культивування має свої недоліки. тривалий час культивування, утруднений контроль параметрів ферментації (температура, рН, аерація), відсутність аерації через високу концентрації твердих частинок. Крім цього, підвищення температури в результаті виділення міцелієм метаболічного тепла може призводити до комкування субстрату в нижніх шарах і зниження вологості у верхніх шарах, що уповільнює зростання грибів [17].

Вивчення питань твердофазної ферментації та усунення її недоліків дозволить підвищити якісні та кількісні характеристики грибів, а також значно знизить собівартість готової продукції.

В даний час для отримання лікарських препаратів з біомаси базидіоміцетів все більшого розвитку набувають методи глибинного культивування грибів [24].

Перспектива отримання лікувально-профілактичних препаратів з застосуванням глибинного міцелію ґрунтується на наукових дослідженнях, які показали, що в глибинному міцелії, як і в плодових тілах, є важливі біологічно активні речовини (БАР).

При глибинному культивуванні міцелій росте в товщі керованої живильного середовища та має однакові умови. Безперервна аерація та механічне перемішування середовища сприяють накопиченню продуктів обміну та швидкого зростання міцелію. У динамічних умовах культивування швидкість дифузії та поширення кисню вища, ніж у стаціонарних. Тому збільшується кількість одержуваного продукту та скорочується час ферментації [38].

На синтез БАР у грибів у глибинній культурі можуть впливати різні фактори. Досліди з деякими штамми *Lentinula edodes* показали, що гриби утворюють у міцелії не тільки глікополімери, а й меланіни, які синтезуються на світлі. Встановлено закономірність – зі збільшенням у міцелії пігментів зростає і кількість ендоглікопротеїнів [27].

Глибинне культивування, на відміну від твердофазного, потребує великих енергетичних витрат на перемішування живильного середовища та його аерацію. Однак процесом глибинного культивування можна легко керувати за допомогою on-line датчиків, у зв'язку з функціонуванням його як однорідного системи.

Одержання біомаси міцелію методом глибинного культивування має ряд переваг перед твердофазною ферментацією. дозволяє регулювати склад комплексу біологічно активних речовин, скоротити тривалість процесу у 8–10 разів, здійснювати спрямований синтез цільових метаболітів, легше контролювати параметри культивування (температура, рН середовища, перемішування, розчинений кисень) [7, 19].

При цьому харчова цінність міцелію базидіоміцетів, вирощених у глибинних умовах, вмісту в ньому білка, незамінних амінокислот і вітамінів порівнянна з плодовими тілами [17].

Глибинне культивування ксилотрофних грибів привертає увагу, як перспективний спосіб виробництва білка. Успіх цього методу в комерційних масштабах ґрунтується на розвитку нових виробничих систем та збільшення виходу біомаси, які вирішують проблеми, пов'язані з технологією вирощування грибів.

## 1.5. Таксонометрія, морфологія та біологічно активні сполуки грибів *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes* та *Grifola frondosa*.

Систематика грибів є морфологічною і побудована на основі цитологічних та фенотипічних ознак. Основні з них: консистенція та тип плодового тіла, тип гіменофора, будова та спосіб утворення базидій, наявність або відсутність пружки на дикаріотичному міцелії, будова гіменія, орнаментация оболонки спори та її

хімічний склад, наявність перфорацій у парентосомі [33, 93]. У таблиці 1.3 представлено систематичне становище грибів *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes* та *Grifola frondosa*.

Таблиця 1.3.

Систематичне положення *A. mellea*, *L. edodes* та *G. frondosa*.

Наукова класифікація	Культура гриба		
Надцарство	<i>Eukaryota</i>	<i>Eukaryota</i>	<i>Eukaryota</i>
Царство	<i>Mycota</i>	<i>Mycota</i>	<i>Mycota</i>
Відділ	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
Клас	<i>Basidiomycetes</i>	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricomycetes</i>
Порядок	<i>Agaricales</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Polyporales</i>
Родина	<i>Physalacriaceae</i>	<i>Omphalotaceae</i>	<i>Meripilaceae</i>
Рід	<i>Armillaria</i>	<i>Lentinula</i>	<i>Grifola</i>
Вид	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Grifola frondosa</i>

За структурою та складом клітинної стінкою гриби відрізняються від тварин та рослин. Клітинна стінка грибів переважно утворена полісахаридом – хітином, що також входить до складу зовнішнього скелета членистоногих, тобто ракоподібних, павукоподібних та комах [33, 40, 51]. Ця речовина більше стійко до мікробного розкладання, на відміну целюлози. У таблиці 1.4 представлені характеристики грибів *A. mellea*, *L. edodes* та *G. frondosa*, а також походження штамів – продуцентів, що використовуються нами у цій роботі.

Основні екологічні групи грибів.

За способом життя розрізняють дві групи грибів: сапробіонти та біотрофи.

Сапробіонти (сапротрофи) – отримують необхідні для них сполуки вуглецю з органічних залишків, у той час як біотрофи (паразити та симбіонти) – використовують як господарів або партнерів тварин, рослини, водорості, бактерії, найпростіші чи інші гриби [13]. Шітаке та мейтаке відносяться до першої групи

сапротрофи, тоді як опеньок осінній можна віднести до перехідного типу - сапротроф і паразит [24].

Осмотрофний тип харчування грибів, який не зустрічається в інших групах організмів, обумовлений швидким зростанням та нитчастою будовою гіфів грибів.

Такий тісний контакт пов'язаний з метаболічною активністю грибів рахунок відсутності шарів відмерлих клітин як у рослин. Виділяються грибами ферменти та інші речовини миттєво впливають на їхнє оточення, що є сприятливим їхнього життя [73].

Біологічно активні сполуки грибів *A. mellea*, *L. edodes* та *G. frondosa*. У традиційній китайській медицині екстракти із плодових тіл *A. mellea* використовуються для лікування неврологічних захворювань організму, включаючи синдром Мен'єра, епілепсію, неврастенію, судоми та гіпертонію [76].

Гриби виду *A. mellea* містять високий рівень полісахаридів, що мають імуномодулюючу активність [77].

Дослідження показали присутність у плодових тілах *A. mellea* протокатехіну, п-гіроксibenзойної, п-кумаринової, ферулової, синапсової, ванільної та коричної кислот. Ці кислоти мають протизапальні, антиоксидантними, антиканцерогенними властивостями [43]. Декілька антибіотиків були виділені з *A. mellea*. Найбільш цінний з них *Armillaridin*, що виявляє сильну дію проти грам позитивних бактерій, таких як *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, а також грибів роду *Candida* [76].

Гриби виду *L. edodes* містять різноманітні біоактивні компоненти. (полісахариди, терпеноїди, феноли, стероїди, глікопротеїди), вітаміни (Вітамін С, рибофлавін, тіамін та ін) [46]. За даними Олександрової Є.А. при екстрагування білків водою виявлено 27 білкових компонентів, тоді як буфером Трис-НСІ - 34 білкові одиниці [28].

Компонентний склад білків штаму *Lentinula edodes* F-249, отриманих при екстракції гриба значно розрізняється. Найбільша кількість білків легкокорозивної фракції характерно для примордій та плодових тіл, тоді як найменша їх кількість виявлена у стадії не пігментованого міцелію.

Гриби *L. edodes* є перенективними продуцентами ліпідів. У в даний час розроблені способи глибинного культивування, що дозволяють отримувати біомасу грибів, що містить до 42% ліпідів. Водні екстракти такого міцелію

показали на моделі *in vitro* з підшкірно щепленим Тлімфолейкоз Р388 гальмування росту пухлини на 60-80% [73]. Крім цього,  $\alpha$ -глюкани виділені з

деяких штамів *L. edodes*, підвищують опірність організму до бактеріальних інфекцій [22], а також до вірусам грипу. Дослідження низки авторів також

показали, що полісахариди *L. edodes* стимулюють імунну систему людини, знижують здатність тромбоцитів у крові до агрегації, мають антибактеріальні,

антивірусними та протизапальними властивостями. Показано, що екстракти з міцелію шийтаке здатні інгібувати вірус імунодефіциту людини.

Гриби виду *G. frondosa* містять полісахариди, що мають сильний протипухлинною дією, які в основному представлені розгалуженими  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-

глюканами [39]. З міцеліального екстракту глибинної культури *G. frondosa* були ідентифіковані  $\beta$ -1,3- та  $\beta$ -1,6-глюкани що відрізняються біологічною активністю

в концентрації 0,01-0,2% і молекулярною масою (470-1650 kDa). Пізніше з *G. frondosa* було виділено полісахарид грифолан, який є розваженим (1,3)- $\beta$ -

глюканом [22]. З поверхні дикаріотичного міцелію грифолі кучерявий виділено лектин з молекулярною масою 68 $\pm$ 1 kDa, що являє собою гідрофільний

глікопротеїн із співвідношенням частин протеїну: глікан як 1:3 [20].

У грифолі кучерявої виявлені речовини, які мають протівірусний дією щодо хронічного гепатиту В та вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ). Дослідження

показали, що *G. frondosa* підвищує загальний імунітет і зменшує рівень глюкози в крові 25% хворих на цукровий діабет 2 типу, стійких до інсуліну. Крім того, цей

гриб ефективний при захворюваннях раку печінки, простати, прямої кишки, грудей та легень [57].

**1.6. Вплив абіогічних факторів на зростання та розвиток бази дієвих грибів.**

*Температура.*

На зростання міцелію та плодових тіл базидієвих грибів суттєве вплив надають абіогічні фактори такі як: температура, вологість, кислотність середовища, освітленість, газовий склад середовища.

Вимоги бази дієвих грибів до температури на різних етапах розвитку визначаються біологічними особливостями виду та штаму. Оптимальна температура для зростання міцелію, як правило, не збігається з температурою, необхідної для плодоношення [63]. При високих температурах гриби гинуть, тоді як холод менш небезпечний. Більшість грибів припиняють свою життєдіяльність при 0°C, але їх можна довго зберігати живими [30].

Температурний оптимум для опенька осіннього (*A. mellea*), шиїтаке (*L. edodes*) та мейтаке (*G. frondosa*) найчастіше знаходиться в межах 23–30°C. При цьому, утворення примордій відбувається за температури 16–21 °C, тоді як формування плодових тіл - 15-18 °C [47]. Відсутність росту грибів за певної температури пояснюється нездатністю організмів синтезувати необхідні вітаміни чи амінокислоти вище 35 °C і нижче 5 °C, зростання базидієвих грибів зупиняється. При вищих температурах, близько 45 °C, культури грибів гинуть через 40 хвилин [34].

В окремих випадках при виділенні таксону температурний критерій може бути вирішальним. Так, грунтуючись на суттєвій відмінності *Pleurotus florida* та *P. osteratus* по верхній температурній межі росту, *P. florida* вважається самостійним видом, хоча дані про статеву сумісність цих видів дозволяють розглядати *P. florida* як форму *P. osteratus*.

Температурний фактор може враховуватися як додаткова таксономічна ознака при ідентифікації культур вищих базидієвих грибів на видовому рівні. При цьому найбільш значущі відмінності в зростанні, що спостерігаються при мінімальних і максимальні температури.

#### Вологість.

Більшість грибів потребує свого розвитку досить високої вологості повітря та субстрату. Багато вищі їстівні базидіоміцети добре розвиваються і плодоносять при вологості вище 60% і особливо при 80- 85% [29].

Гриби *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes* та *Grifola frondosa* найчастіше розвиваються на деревині, що має відносну вологість трохи більше 60% [24]. При вищому вмісті вологи гриби страждають від нестачі кисню. При недостатній вологості вони не можуть нормально розвиватися, втрачається пружність клітин, пропорції між ніжкою та капелюшком порушуються.

Відомо, що при інтенсивному культивуванні оптимальне вміст вологості компонентів субстратів знаходиться в межах 55-70% [18]. Рівень вологості субстратів обумовлений їх розміром частинок та кількістю води, яка буде втрачена в період інкубації. Зріст міцелію зупиняється, якщо рівень вологості стає нижчим за 40%. Якщо вміст вологості 50% - зростання відновлюється, міцелій стає яскраво білого кольору та нормальної щільності. Відносна вологість повітря в час формування примордій базидіальних грибів має бути 95-100%, а під час формування плодових тіл - 60-75% [8, 18].

*Кислотність середовища.*  
Одним з найважливіших факторів, що регулюють метаболізм та зростання вищих базидіальні гриби в культурі є рН живильного середовища. Для більшості грибів оптимальні значення рН знаходяться в межах 5-6, хоча багато хто з них здатний рости при значних змінах показників кислотності [53]. Існує думка, що у мікоризоутворювачів сприятливими для зростання є кислі значення рН середовища, тоді як при нейтральних та лужних значеннях спостерігається слабкий розвиток. Гриби, що належать до однієї і тієї ж систематичної або екологічної категорії, можуть суттєво відрізнитися по відношенню до вихідного рН середовища, змінюючи його у сприятливий чи несприятливий для зростання бік.

Це залежить як від фізіологічних особливостей гриба, і від складу живильного середовища [19]. Існують види, що володіють здатністю руйнувати целюлозу та регулювати кислотність середовища до нижчих значень рН порівняно з лігніноруйнівними грибами. При цьому штами одного і того ж виду, виділені з різних місцепроживання, розрізняються по відношенню до рН середовища [6].



Концентрація водневих іонів у середовищі істотно впливає на характер метаболічних процесів. У зв'язку з цим представляється необхідно попередньо встановити ті межі рН, в яких відбувається активне зростання випробуваних штамів.

Враховуючи при цьому, що оптимальний рН середовища буде різним на різних середовищах, залежатиме від інших умов культивування і може бути точно визначено лише для конкретних умов проведення ферментаційного процесу [16].

Серед представників відділу *Basidiomycota* у діапазоні рН від 2 до 10 зростає 32% досліджених у світі штамів. Це переважно лігнотрофні види *Lentinus lepideus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota aurivella*, *Panus conchatus*, *P. tigrinus*, а також деякі види мікоризоутворювачів та сапротрофів: *Coprinus comatus*, *Agaricus arvensis*, *Lepista nuda*, *Clitocybe nebularis*.

У вузьких межах кислотності середовища ростуть *Armillaria mellea*, *Coprinus ephemerus*, *Marasmius oreades*. У грибів *Armillaria mellea*, *Agaricus bisporus*, *Marasmius scorodonium* і *Coprinus ephemerus* максимальна кількість міцелію утворюється при кислотних вихідних значеннях рН середовища. У процесі зростання ці гриби підкислюють середовище [8, 59].

Деякі штами таких видів, як *Flammulina velutipes*, *Oudemansiella radicata*, *Suillus variegatus*, *Lepista nuda* утворюють найбільшу кількість міцелію при лужних та нейтральних початкових значеннях рН. Гриби видів *Pholiota adiposa*, *Marasmius oreades*, *Panus tigrinus*, *P. conchatus* у процесі зростання змінюють рН середовища до оптимальних для зростання значень. У деяких видів максимальне утворення міцелію відзначено при двох значеннях рН середовища: *Pholiota adiposa* та *Pleurotus ostreatus* – 6 та 9, у *Agaricus arvensis* – 5 та 9 [8].

#### Освітленість.

Світло є важливим абіотичним фактором, що впливає на зростання і розвиток грибів, регулюючи послідовність біохімічних та біофізичних процесів, що призводять до фототропних реакцій [26].

У літературі відсутні дані, що свідчать про необхідність світла у розвиток міцелію на початок процесу плодоутворення. Однак відзначено, що світловий вплив впливає на морфологію культур грибів. Наявність або відсутність

світлового фактора під час зростання міцелію відбивається на характері подальшого плодоношення [34].

У багатьох видів при недостатньому освітленні або у темряві утворюються лише примордії без утворення плодових тіл. Тривалість та інтенсивність освітлення впливають на строки появи плодових тіл, форму, забарвлення, величину та ступінь розвитку [35].

Виділяють чотири групи. У першій групі утворення примордій і плодових тіл відбувається однаково в темряві та на світлі (*Agaricus bisporus*). До другої групи входять види грибів, у яких примордії утворюються як у світлі, і у темряві, а плодові тіла формуються лише з світла (*Lentinula edodes*). Відповідно до дослідників Посидинок Н.Л. та Бісько Н.А. [97] утворення плодових тіл у *Lentinula edodes* відбувається при експозиції світла у 100–300 люкс. Нижче 100 та вище 300 люкс формування плодових тіл пригнічувалося.

За даними Вассера С.П. [23] формування примордій та плодових тіл *Lentinula edodes* і *Pleurotus osteratus* має відбуватися за високої освітленості, що становить 500–2000 люкс. При цьому формування примордій у *Lentinula edodes* стимулюється щодо низьким рівнем освітленості (500 люкс). Якщо в цьому періоді не збільшити освітленість (до 1000 люкс), то розвиток плодових тіл уповільнюватиметься.

Грибам третьої групи для початку та завершення плодоношення необхідний світло, але в проміжних стадіях вони вимагають темного періоду. У представників четвертої групи (*Favolus arcularius*) освіта примордій та формування плодових тіл здійснюються лише на світлі.

Утворення плодових тіл у опенька зимового (*Flammulina velutipes*) і гнойовика волосистоного (*Coprinus lagopus*) стимулюється синьою частиною видимого діапазону (520 нм). Хвилі червоної та зеленої частин спектру надають слабе впливом геть формування плодових тіл грибів. Для плодоношення *Pleurotus ostreatus* та *Lentinula edodes* необхідно освітлення понад 150 люкс [25, 26].

Склад газового середовища.

Базидієві гриби є аеробними гетеротрофними організмами, які одержують необхідну енергію лише у процесі дихання. Продукти дихання – вода та вуглекислий газ. Відомо, що на зростання та розвиток грибів впливає склад атмосферного повітря (концентрація CO<sub>2</sub> та інших летких газів). Потреба грибів у кисні не визначається загальним правилом. Існують гриби, які не реагують на нестачу кисню, тоді як інші уповільнюють зростання, у разі його нестачі [151].

Вивчення фізіологічних процесів сапротрофних грибів при їх культивуванні у штучних умовах показало, що газообмін грає велике значення між грибами, що ростуть на субстраті, і навколишнім середовищем. Багатьом суворо аеробним грибам потрібно низька кількість кисню – 2–5 % від атмосферного змісту.

За даними Беккер З.Е. [6] збільшення вмісту CO<sub>2</sub> до 0,6% (6000 ppm) стимулює зростання міцелію вищих їстівних базидіоміцетів. Однак при рівні від 0,4% до 0,6% формування примордій пригнічується. Також цим автором показано, що з концентрації CO<sub>2</sub> – 0,2 % і 0,4 % примордії з'являються деформованими і плодові тіла мають маленькі капелюшки та довгі ніжки. Рівень CO<sub>2</sub> нижче 0,2% є оптимумом для плодоношення.

Варто зазначити, що у літературі є дані про те, що зміст CO<sub>2</sub> у субстраті служить захисним бар'єром для міцелію базидіальних їстівних грибів від впливу сторонньої мікрофлори, що за високої концентрації CO<sub>2</sub> може загинути чи дуже слабо зростати [6, 78]. Таким чином, зробивши огляд літератури щодо впливу абіотичних факторів на зростання та розвиток базидіоміцетів і, зокрема, культур *A. mellea*, *L. edodes* та *G. frondosa*, було показано, що їх фізіологічні процеси залежать від температури, вологості, реакції середовища, освітленості та аерації.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали досліджень

В експериментах був використаний промисловий штам *Agaricus bisporus* 512, поширений у грибівницьких господарствах та зберігається в колекції міцеліальних культур Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного. Також використано культуру гриба *Thielavia terrestris* штаму F/144, отримана з колекції. Культивування штампів та вивчення особливостей розвитку міцеліальних культур проводили за загальноприйнятими методиками [6].

### 2.2. Методика приготування компосту.

Органічні компости готували по наступною схемою: замочували пшеничну солому протягом двох-п'яти діб, систематично поливаючи водою. Потім проводили формування штабеля [7]. Для цього розділяли солому на рівні частини, укладали пласт зволоженої соломи, поверх якого розміщували шар гною, операцію повторювали до утворення штабеля. За п'ять-сім днів робили перебивку одержаної конструкції. Під час перемішування та зволоження вміст пересипали гіпсом.

Після трьох-п'яти днів виконували наступну перебивку штабелю та зволоження суміші. У міру мікробної ферментації відбувається нагрівання всередині штабелі до температури 55-70 °С. Потім проводили укладання компосту в мішки та його термообробку: спочатку витримували 12 годин при температурі 60 °С, потім поступово знижували температуру на 1-2 °С день.

Застиглий після такої термообробки до 46-48°C субстрат використовували для інокуляції мицелію печериць.

### 2.3. Методика визначення вмісту компосту.

Загальний азот у складі компосту визначали за методом К'єльдаля, зміст загального фосфору визначали за методом Дейже [7]. Реакцію середовища визначали в водній витяжки із субстрату за ГОСТ 26423-85 [8]. Біологічну ефективність вирощування базидіом визначали як відношення сирової маси грибів

НУБІП України  
до сухої масі субстрату. За цим показником визначають урожайність грибів на різних за складом та вологості субстратах [8, 9]. Коефіцієнт конверсії розраховували як відношення сухої маси грибів до сухої маси субстрату.

Значення цього показника дозволяють провести аналіз конверсії поживних речовин плодовими тілами грибів, одержаних на компостах різного складу. Усі експерименти проводилися у триразовій повторності. Статистична обробка проводилася за допомогою програми обробки та аналізу даних «Statistica 6.0».

Оцінка достовірності впливу на продуктивні параметри з боку різних факторів здійснювали за допомогою дисперсійного аналізу отриманого масиву даних (ANOVA). Для оцінки значущості даних використовувався критерій Стьюдента за рівня значимості 0,95 [10].

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Хімічний та мікробіологічний аналіз субстратних композицій.

На першому етапі проведеної дослідницької роботи здійснювався хімічний та мікробіологічний аналіз субстратних композицій. Як контрольний зразок компосту була використана суміш пшеничної соломи та посліду курей-бройлерів підстилкового матеріалу на основі подрібненої соломи, яка приготовлена за загальноприйнятою методикою. Досвідчений зразок компосту являв собою суміш пшеничного соломи і посліду індичок на основі соломи і тирси листяних порід (2:1). Компости готували із розрахунку співвідношення соломи та послід 10:7.

Приготовлені відповідно до рецептури та готові до інкуляції компости були піддані аналізу на кислотність, вміст загального азоту, загального фосфору та калію. Встановлено, що складена у досліді субстратна композиція відрізнялася від контрольної по вищезазначеним показникам (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.  
Результати хімічного аналізу компостів різного складу,  
повторність триразова,  $p < 0,05$

Варіант компосту з додаванням	Показник (усереднений)						Консистенція
	Вологість, %	Зола, г/кг	pH	N, г/кг	P, г/кг	K, г/кг	
Послід бройлерів	21	70	5,9	1,68±0,02	1,5±0,05	0,90±0,01	Сухий, дрібнодисперсний, з грудками
Послід-підстилковий матеріал курей-несучок	34	134	6,2	2,23±0,01	1,6±0,03	1,2±0,01	Пухкий, відрізки соломи 1,5-5,0 см, з помітною кіркою
Послід-підстилковий матеріал індичок	30	162	5,1	2,61±0,04	2,0±0,03	0,85±0,02	Щільний, тирса розміром 0,2-2,5 см, рівномірно перемішані з послідом

З таблиці видно, що варіант компосту з додаванням послід-підстилкового матеріалу індичок значно перевищує варіанти з додаванням курячого посліду за вмістом загального азоту і фосфору. У зв'язку з чим згодом проводилася корекція привнесенням до субстрату відповідних джерел біогенних елементів. При цьому

Особлива увага приділялося носіям азоту, тому що саме їх перетворення на аміак у мікробіологічних процесах може сприяти негативним змінам газового складу оточуючого міцелій повітря, а також значно збільшувати рН компосту.

У такому компості міцелій печериць розвивається погано, заростання міцелієм субстрату відбувається нерівномірно. У результаті корекції підсумковий зміст основних біогенів (N, P, K,) як в дослідженому, так і в контрольному зразках компосту становило 1,8%, 1,2%, 1,8% відповідно.

Мікробіологічний аналіз проводився за показником загального мікробного числа (ЗМЧ) з неглибоким таксономічним диференціюванням представників, що виявляються. У різних субстратних композиціях ці показники відрізнялися дуже значно (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Загальне мікробне число та особливості мікрофлори\* витяжок із субстратів,

повторність триразова,  $p < 0,05$

Субстрат	Значення ЗМЧ	Наявність бактерій	Показник Наявність дріжджів	Наявність міцеліальних грибів	Наявність актиноміцетів
Послід бройлерів	$14,5 \times 10^3$	++++	-	+	-
Послід підстилковий матеріал курей-несучок	$21,5 \times 10^5$	++	+	+++	+
Послід-підстилковий матеріал індичок	$4,6 \times 10^3$	-	-	+	-

\* Позначення: - відсутність мікрофлори; "+" одинична присутність, "++" достатня представленість; «+++» помітне переважання; «++++» яскрава перевага

Так, за якісним складом у посліді курей різко переважали бактерії (*Staphilococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *E. coli*). У матеріалі з курячою підстилкою переважали бактерії *Streptococcus* sp., *Staphilococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *E. coli*, цвільові гриби *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., виявлено дріжджі *Candida* sp. Цей матеріал виявився найбільш багатим на різноманітну мікрофлору. Заслуговує на увагу відсутність бактеріальної мікрофлори у матеріалі

підстилки індичок, де виявлено тільки міцеліальні гриби *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. Це може пояснюватись вираженою кислотністю вивченого субстрату або особливостями технології утримання птахів.

Приготовлені за вказаною вище методикою компости поміщали в пластикові ящики об'ємом по шість літрів, інокулювали їх міцелієм печериці штам *Agaricus bisporus* 512 та інкубували в лабораторних умовах для отримання плодових тіл за загальноприйнятою методикою. Терміни освоєння компостів міцелієм печериці істотно вар'їрували.

Так, компост на основі посліду бройлерів був освоєний в першу чергу,  $12 \pm 2$  добу. Поява примордій відзначено на  $7 \pm 2$  добу після нанесення покривної землі, плодові тіла на даному субстраті формувалися масово. Компост на основі підстилкового матеріалу з-під курей-несучок освоювався повільніше, хоча відмінності спостерігалися у межах статистичної помилки. Інтенсивність утворення зародків плодових тіл на цьому компості була дещо нижчою, щодо першого варіанта. Третій варіант компосту, заснований на підстилковому матеріалі індички, був освоєний міцелієм у більш розтягнуті терміни на  $18 \pm 3$  добу, поява зачатків плодових тіл було виражено слабо. Вони сформувалися поодинокі.

Перша хвиля плодоношення тривала від чотирьох до восьми діб у різних варіантах дослідів. Максимальна врожайність у першу хвилю плодоношення склала  $6,9 \pm 0,7$  кг/м<sup>2</sup> і була отримана на контрольному варіанті компосту. На другому та третьому варіантах з використанням помітно-підстильних матеріалів кур несучок та індички в першу хвилю плодоношення було отримано, відповідно,  $5,7 \pm 0,72$  кг/м<sup>2</sup> та  $4,4 \pm 0,1$  кг/м<sup>2</sup> біомаси плодових тіл печериць. Протягом другої хвилі плодоношення врожайність була пропорційно нижче. Сумарна врожайність за дві хвилі плодоношення представлена на рис. 3.1.

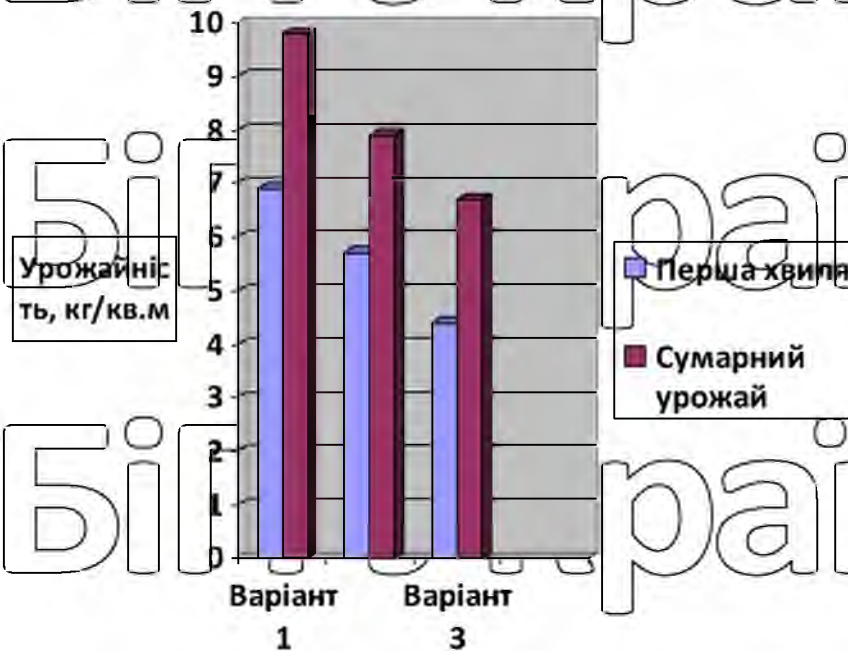
НУБІП України



# НУБІП України

# НУБІП України

# НУБІП України



# НУБІП України

Рис. 3.1 Урожайність пеньки на різних компостах: варіант 1 – компост на основі

посліду бройлерів; варіант 2 – компост на основі підстилкового матеріалу з-під

курей-несучок; варіант 3 – компост, заснований на підстилковому матеріалі

індички ( $p > 0,05$ , планки похибок – помилка середньої)

Третя хвиля плодощення була неефективною у всіх випадках через малий обсяг субстратів у ящиках невеликого розміру. Таким чином, з вивчених композицій компост з використанням підстилкового матеріалу індички найменш ефективний.

Коефіцієнт конверсії речовин компосту, приготовленого на основі посліду бройлерів, становив 8,9%; на основі підстилкового матеріалу з-під курей-несучок – 5,7%; а компосту, заснованого на підстилковому матеріалі індички, – лише 2,4% (рис. 3.2).

# НУБІП України

Рис. 3.2. Коефіцієнти конверсії речовин міцелієм на різних компостах: варіант 1 – компост на основі посліду бройлерів; варіант 2 - компост на основі підстилкового матеріалу з-під курей-несучок, варіант 3 - компост, заснований на підстилковому матеріалі індички ( $p > 0,05$ , планки похибок – помилка середньої)

Такі результати можуть пояснюватися відносно високим вмістом сухої речовини, а також низькими показниками врожайності печериць на компості з використанням посліду індички.

Низький вміст мікроорганізмів у матеріалі підстилки індички, наявність в ньому значної кількості тирси, низькі значення рН свідчать про його малу придатність в якості компосту для вирощування печериць. Виникає питання необхідності модифікації цього матеріалу з метою зміни його структури та властивостей. Для цього субстрат з додаванням посліду індички ферментували з використанням термофільного гриба *Thielavia terrestris*, який здійснюючи біодеструкцію тирси, сприяє якійсь зміні складу компосту.

Культуру гриба, вирощену в глибинних умовах, вносили в компост на стадії пошарове укладання в кількості 10,0 г/кг компосту. Контролем служив компост, приготований звичайним способом (помітно-підстилочна суміш та пшенична солома). Ферментацію здійснювали протягом двох тижнів. У дослідному варіанті відзначено значне розпушення субстрату. Готові компости були поміщені у пластикові ящики та інокульовані міцелієм печериці. Освоєння компосту міцелієм у досліді відбувалося помітно активніше. Покривний ґрунт у дослідному варіанті нанесли на 15 добу після інокуляції, тоді як у контрольному – лише на 18-20.

Облік урожайності на компості, попередньо підданому ферментації термофільним міцеліальним грибом *Thielavia terrestris* показав, що результат значно перевищив контрольні показники (рис.3.3.) і склав 9,4 кг/м<sup>2</sup>, що можна порівняти з урожайністю печериці на компості з використанням посліду бройлерів (рис. 3.1). Це, мабуть, пов'язано з тим, що гриби ферменти *Thielavia terrestris* сприяли перетворенню лігноцелюлозних компонентів підстилки на доступні для асиміляції міцелієм печериці цукру. На це вказує і різко збільшений

коєфіцієнт конверсії поживних речовин субстрату (рис. 3.4.), який майже втричі вище, ніж у контролі без використання *Thielavia terrestris*. Необхідно відзначити, що отриманий коєфіцієнт конверсії виявився вищим на 6,3%, ніж у варіанті з використання послід-підстилкового матеріалу курей-несучок, хоча і трохи нижче коєфіцієнта конверсії компосту на основі посліду бройлерів.

Отримані результати свідчать про значний спектр можливостей оптимізації субстратів з метою їхнього конверсії міцелієм їстівних грибів. Прийоми вдосконалення соломистих субстратів у зазначених цілях для ксилотрофних грибів широко обговорюються. Існують відомості про спроби інтенсифікації розвитку у культурі за рахунок модифікації субстратів та у відносинах гумусових сапротрофів. Особливе значення має дослідження можливостей оптимізації культивування їстівних грибів, по-перше, з потенційних позицій небезпеки для споживачів дикоростучих, по-друге, з урахуванням визнання їх цінних і навіть лікувальних властивостей. Однак, вивчені нами прийоми паралельної ферментації субстратів є оригінальним напрямком, у зв'язку з чим є доцільним продовження досліджень.

абруднення навколишнього середовища, збіднення лісових угідь, масова вирубка лісів призвели до того, що населення міст все менше використовує дикорослі їстівні гриби для харчових цілей. Крім того, у всьому світі в умовах швидкого зростання чисельності населення проблема дефіциту та якості білкових продуктів продовжує залишатись актуальною. Традиційне сільськогосподарське виробництво білка у вигляді продукції рослинництва, тваринництва та птахівництва не справляється з потребами сучасного суспільства на повноцінному харчуванні. За даними FAO/WHO населення багатьох країн різною мірою потребує додаткових джерел білка. Нестача білка в харчуванні є одним з основних факторів зниження середньої тривалості життя і вкрай необхідний дітям для розумового та фізичного розвитку. Відомо, що харчова промисловість потребує нових функціональних та профілактичних продуктах харчування, у тому

числі з грибів, які при регулярному застосуванні можуть надавати оздоровчу дію на організм людини.

В даний час світові обсяги відходів виробництв сільського та лісового господарств становлять найбільшу групу щорічно поновлюваного рослинної сировини – 2,5 та 3,2 млрд. тонн, відповідно.

Серед альтернативних методів отримання білка та біологічно активних речовин особливо перспективними є виробництво міцелію та плодових тіл ксилотрофних видів грибів, за умов регульованого мікроклімату. В цих методи особливого значення надаються оптимізації умов культивування з використанням абіотичних факторів та ендогенних регуляторів зростання.

В Україні її широко застосовують у їжу переважно печериці (*Agaricus bisporus*) та гливи (*Pleurotus ostreatus*), технології вирощування яких постійно удосконалюються. Водночас у багатьох країнах світу проводяться активні дослідження з культивування тих видів грибів, які широко використовувалися у народній медицині. Проте їхнє культивування ускладнюється дефіцитом сировини та проблемами біобезпеки через алергічну дію спор грибів.

Серед активно культивованих грибів до найбільш перспективних, безумовно, відносять і лікарські види базидіоміцетів, таких як шиї таке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) (світове виробництво 700 тис. на рік) та мейтаку (*Grifola frondosa* (Dicks: Fr) Gray) (125 тис. тонн на рік), що поєднують у собі високу швидкість росту, біологічну активність та відсутність токсикантів, будучи сировиною отримання лікарських препаратів. Культивування цих видів грибів у промислових масштабах здійснюється в основному в країнах Південно-Східної Азії, Європи та Америки на місцевій лігноцелюлозній сировині. (Деревина бука, дуба, клена, рисове лушпиння, селомат та ін).

НУБІП України

# НУБІП України

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено позитивний ефект використання прийому попередньої ферментації субстрату (послід-підстилкового матеріалу Індички), багатого джерелами целюлози та лігніну, міцелієм *Thielavia terrestris* для подальшої утилізації поживних речовин міцелієм істивного гриба печериці та підвищення його врожайності на цьому субстраті.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Барштейн В.Ю. Амінокислотний склад продуктів біоконверсії шроту насіння амаранту вищими грибами // Проблеми харчування. – 2009. – № 3-4. – С. 5–18.

1. Бухало А.С., Митропольская Н.Ю., Михайлова О.Б. Каталог колекції культур шапинкових грибів ІБК. – К.: Алтерпрес, 2011. – 100 с.

4. Сжов В.М. Біотехнологічні основи виробництва білка і пектину з відходів переробки плодів та винограду – К.: Урожай, 1993. – 120 с.

2. Круподьорова Т.А. Ріст *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. і *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. та синтез екзополісахаридів в умовах глибинного культивування // Біотехнологія. – 2011. – № 6. – С. 60–67.

3. Круподьорова Т.А., Барштейн В.Ю. Альтернативні субстрати для культивування лікарських та їстівних грибів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 1. – С. 47–56.

4. Круподьорова Т.А., Барштейн В.Ю., Бісько Н.А., Іванова Т.С. Склад міцеліальної маси та культуральної рідини *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes) // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – № 3. – С. 78–87.

5. Круподьорова Т.А., Барштейн В.Ю., Пещук Л.В., Гашук О.І., Костенко Є.Є. Культивування *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm. на рослинних відходах // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – № 4. – С. 92–99.

5. Ломберг М. Л. Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.21 „Мікологія” / М. Л. Ломберг. – К., 2005. – 20 с.

6. Abd Razak D.L., Abdullah N., Johari N.M.K., Sabaratnam V. Comparative study of mycelia growth and sporophore yield of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc on selected palm oil wastes as fruiting substrate // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – 97 (7). – P. 3207–3213.

7. Adebayo G.J., Omolara B.N., Toyin A.E. Evaluation of yield of Oyster mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) grown on cotton waste and cassava peel // *Afr. J. Biotechnol.* – 2009. – 8. – P. 215–218.

8. Adedokun O.M., Akuma A.H. Maximizing agricultural residues: nutritional properties of straw mushroom on maize husk, waste cotton and plantain leaves // *Natural Resources*. – 2013. – 4. – P. 534–537.

9. Adedokun O.M. Oyster mushroom: Exploration of additional agro-waste substrates in Nigeria // *Int. J. Agric. Res*. – 2014. – 9. – P. 55–59.

10. Aguilar-Rivera N., Moran A.C., Rodriguez Lagunas D.A., Gonzalez J.M. Production of *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom) grown on sugar cane biomass (trash, bagasse and pith). In: S. Andres and N. Baumann (Ed.). *Mushrooms: types, properties and nutrition*. – New York: Nova Science Publishers, 2012. – P. 77–104.

11. Ahmed S.A., Kadam J.A., Mane V.P., Patil S.S., Baig M.M.V. Biological efficiency and nutritional contents of *Pleurotus florida* (Mont.) Singer cultivated on different agro-wastes // *Nature and Science*. – 2009. Vol. 7. № 1. – P. 44–48.

12. Al Abttan A.A.H., Shareef H.R., Fahad M.A. Cultivation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) in some manufacturing wastes of food // *Al-Taqan Journal*. – 2005. Vol. 18. № 3. – P. 1–5.

13. Alam N., Amin R., Khair A., Lee T.C. Influence of different supplements on the commercial cultivation of milky white mushroom // *Mycobiology*. – 2010. Vol. 38. № 3. – P. 184–188.

14. Krupodorova T.A., Barshteyn V.Yu. Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation // *J. BioSci. Biotechnol.* – 2015. Vol. 4. № 3. – P. 339–347.

15. Krupodorova T.A., Barshteyn V.Yu., Bisko N.A., Ivanova T.S. Some macronutrient content in mycelia and culture broth of medicinal mushrooms cultivated on Amaranth flour // *Int. J. Med. Mushrooms*. – 2012. Vol. 14. № 3. – P. 285–293.

16. Krupodorova T.A., Rybalko S.L., Barshteyn V.Yu. Antiviral activity of Basidiomycete mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture // *Virol. Sin.* – 2014. Vol. 29. № 5. – P. 284–290.

17. Lakshmi S.S. In vivo utilization of seafood processing wastes for cultivation of the medicinal mushroom (*Ganoderma lucidum*) using agro-industrial waste // *Asian. J. Pharm. Clin. Res.* – 2013. Vol. 6. № 4. – P. 51–54.

18. Magingo F.S., Oriyo N.M., Kivaisi A.K., Danell E. Cultivation of *Oudemansiella*

tanzanica nom. prov. on agricultural solid wastes in Tanzania // Mycologia. – 2004. Vol. 96. № 2. – P. 197–204.

19. Mane V.P., Patil S.S., Syed A.A., Baig M.M.V. Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer // Journal of Zhejiang University Science B – Biomedicine & Biotechnology. – 2007.

Vol. 8. № 10. – P. 745–751.

20. Yang F.C., Ma T.W., Chuang Y.T. Medium modification to enhance the formation of bioactive metabolites in shake flask cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding citrus peel extract // Bioproc. Biosyst. Eng. – 2012. Vol. 35. № 8. – P. 1251–1258.

21. *Agaricus bisporus* and related *Agaricus* species on lignocellulose: Production of manganese peroxidase and multicopper oxidases / K. Hildén [et al] – Fungal Genetics and Biology. – Volume 55. – 2013. – P. 32-41.

22. Regional Discrimination of *Agaricus bisporus* Mushroom using the Natural Stable Isotope Ratios / I. M. Chung [et al] – Food Chemistry. – Volume 264. – 2018. – P. 92-100.

23. Anti-Inflammatory Potential of In Vitro Cultures of the White Button Mushroom, *Agaricus bisporus* (Agaricomycetes), in Caco-2 Cells / B. Muszynska [et al] – International Journal of Medicinal Mushrooms. – Volume 2. – 2018. – P. 129-139.

7. Chang S.-T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 1999. – Vol. 1, № 1. – P. 1–7.

24. Gold, M.A. A Competitive Market Analysis of the United States Shiitake Mushroom Marketplace // M.A. Gold, M.M. Cernusca, L.D. Godsey // Horttechnology. – 2008. – Vol. 18(3). – P. 489–499.

25. Grigoryan, K.M. Effect of water activity, pH and temperature on contamination level of dried vine fruit by filamentous fungi during storage / K.M. Grigoryan, L.L. Hakobyan // Chemistry and Biology. – 2015. – №3. – P. 23–28.

26. Hamelinck, C.N. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term / C.N. Hamelinck, G.V. Hooijdonk, A.P.C. Faaij // Biomass and bioenergy. – 2005. – Vol. 28, № 4. – P. 384–410.



27. Hansen, L. Nordic macromycetes (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales) / L. Hansen, H. Knudsen // Nordsvamp-Copenhagen. – 1992. – Vol. 2. – P. 474.

28. Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture / N. Hatvani // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2001. –

Vol. 17, №1. – P. 71–74.

29. Ibrahim, M. Effect of Temperature and Relative Humidity on the Growth of *Helminthosporium fulvum* / M. Ibrahim, A.B. Rabah, B. Liman, N.T. Ibrahim // Nig. J. Basic and Appl. Sci. – 2011. – 19 (1). – P. 127–129.

30. Jonathan, S.G. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* Berk and *Schizophyllum commune* (Fr. ex Fr.) Fr from Nigeria / S.G. Jonathan, I.O. Fasidi // Food Chemistry. – 2001. – Vol. 75. – P. 303–307.

31. Jorgensen, H. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities / H. Jorgensen, J.B. Kristensen, C. Felby // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2007. – Vol. 1, №2. – P. 119–134.

32. Kalac, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review/P. Kalac // Food Chem. – 2009. – № 9–16. – P. 627–633.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України