

В.М. Ліновицька¹, А.С. Бухало², О.М. Швед³, О.М. Дуган¹¹ Національний технічний університет України "КПІ",² Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,³ Національний університет "Львівська політехніка",

кафедра технології біологічно-активних сполук, фармацевції та біотехнології

СТВОРЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ НА ОСНОВІ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ВИЩОГО БАЗИДИОМЦЕТУ *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE*

Ї Ліновицька В.М., Бухало А.С., Швед О.М., Дуган О.М., 2011

Вивчено вплив джерел вуглецю і азоту, рН та компонентів поживних середовищ (пивне сусло, буякова меляса, кукурудзяний екстракт, пептон, екстракт кормових дріжджів) на накопичення екзополісахаридів та біомаси під час культивування вищого базидіального гриба *Schizophyllum commune*. Визначено сприятливі для біосинтезу екзополісахаридів та біомаси комплексні поживні середовища з глюкозою, нітратом амонію та кукурудзяним екстрактом. Запропоновано біотехнологію виробництва шизофілану.

Ключові слова: біотехнологія, *Schizophyllum commune*, шизофілан, глибинне культивування, комплексні рідкі поживні середовища.

Influence of sources of carbon and nitrogen, pH and components of nutrient mediums (beer wort, molasses, corn extract, peptone, extract of yeasts) on the accumulation of exopolysaccharide and biomass under cultivation of higher basidiomycetes mushroom of *Schizophyllum commune*. was studied. Complex nutrient mediums with glucose, ammonium nitrate and corn extract for biosynthesis of exopolysaccharide and biomass were determined. Biotechnology of schizophyllan was proposed.

Key words: biotechnology, *Schizophyllum commune*, schizophyllan, submerged cultivation, complex liquid nourishing mediums.

Вступ. Отримання екологічно чистих, фізіологічно безпечних харчових продуктів, а також лікувально-профілактичних препаратів є надзвичайно важливою проблемою для України.

Дослідження різних видів лігнотрофних базидіомцетів, що за сучасними даними мають імуностимулювальну, антиоксидантну, протипухлинну, антивірусну та адаптогенну дію, призвели до того, що за кордоном вже виробляють лікувальні препарати та нутрицевтики на їх основі [1, 2]. Біологічно активними речовинами, що обумовлюють лікувальні ефекти таких препаратів, є білки, деякі низькомолекулярні сполуки та полісахариди, насамперед β-D-глюкани: грифолан, лентинан, коріолан і, зокрема, шизофілан з *Schizophyllum commune*.

З огляду на те, що виробництв, які використовують глибинне культивування вищих базидіомцетів сьогодні в Україні не існує, впровадження в промисловість вітчизняних біотехнологій є актуальним.

Також важливим, з погляду створення та розроблення нових біотехнологій з використанням в якості продуценту *Schizophyllum commune*, є те, що з нього можна не тільки отримати продукти лікувально-профілактичного, а й промислового призначення, наприклад, різноманітні гідролітичні ферменти. Крім того, застосуванням як компоненти поживних середовищ низки дешевих побічних продуктів та відходів сільськогосподарського та промислового походження можна як підвищити ефективність виробництва, так і сприяти їх утилізації.

Аналіз досліджень і публікацій. Особливості глибинного культивування *S. commune* в літературі висвітлено недостатньо. В основному, в якості середовищ використовують сольовий

розчин з додаванням глюкози ($20-40 \text{ г/дм}^3$) та різноманітних джерел ростових факторів – пептон, дріжджовий екстракт, картопляний відвар, мальц-екстракт [3–6]. Але наведені авторами відомості не завжди повні і іноді суперечливі, тому існує необхідність в подальших поглиблених дослідженнях *S. commune* в різних умовах культивування, як в напрямку розширення теоретичних знань стосовно біології цього базидіоміцету, так і з точки зору створення нових вітчизняних біотехнологій отримання різноманітних БАР, в першу чергу полісахаридів лікувально-профілактичного призначення.

Шизофілан – полісахарид, виділений з культуральної рідини *S. commune*, який проявляє протипухлинні властивості і являє собою нейтральний β -1,3-глюкан, що має молекулярну масу $450-1000 \text{ kD}$ та стабільність при температурі до $+145^\circ\text{C}$ [7, 8]. Шизофілан підтримує та посилює клітинний імунітет та протипухлинні механізми [9]. Відбувається активація макрофагів, нейтрофілів та натуральних кілерних клітин по відношенню до пухлинних клітин [10, 11] та підвищується синтез інтерлейкінів та ФНП [12]

Постановка задачі. Мета роботи: оцінювання фізіолого-біохімічних особливостей у різних штамів вищого базидіоміцету *Schizophyllum commune* залежно від умов глибинного культивування та підбір компонентів поживних середовищ для створення біотехнології виробництва екзополісахариду шизофілану.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були 6 штамів *Schizophyllum commune* Fr., отриманих з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім.М.Г.Холодного НАН України, два з яких виділені авторами з природного середовища України.

Глибинне культивування проводили в колбах Ерленмеєра на 100 або 250 мл, в умовах постійного перемішування за допомогою орбітальної качалки ($170-180 \text{ об/хв}$), при температурі (28 ± 1) $^\circ\text{C}$. Середовища інокулювали попередньо отриманою фізіологічно активною глибинною культурою в кількості 10 об'ємних відсотків.

В якості мінеральної основи для середовищ використовували сольовий розчин наступного складу (г/дм^3): $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 3$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1$; $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,6$; глюкоза – 20 [3]. При цьому, для різних варіантів досліджень в якості ростових факторів та додаткових джерел азоту та вуглецю вносилися в кількості еквівалентній 1 г/дм^3 глюкози один з наступних компонентів: пивне сусло, бурякова меляса, кукурудзяний екстракт (КЕ), пептон, екстракт кормових дріжджів (ЕКД). Контрольне середовище не містило таких домішок.

Протягом культивування раз на добу проводили відбір проб культуральної рідини. У пробах визначали рН, вміст біомаси, білку, редуруючих речовин та екзополісахаридів.

Рівень накопичення біомаси визначали ваговим методом, висушуючи міцелій до постійної маси при температурі (105 ± 1) $^\circ\text{C}$ [13]. Вміст редуруючих речовин у культуральній рідині визначали фериціанідним методом [14].

Концентрацію білку визначали методом Лоурі [15].

Для визначення концентрації екзополісахаридів спочатку проводили осадження 5 мл культуральної рідини 10 мл 96 % етанолу та відстоювання протягом доби при (4 ± 1) $^\circ\text{C}$, після чого осад відокремлювали центрифугуванням впродовж 25 хвилин при 6–7 тис. об/хв, розчиняли в 5 мл гарячої дистильованої води та відбирали 2 мл розчину, в якому визначали кількість екзополісахаридів фенол-сірчанним методом [16].

Для визначення найсприятливіших для накопичення біомаси та екзополісахаридів джерел вуглецю використовували те саме мінеральне середовище, до якого в якості єдиного джерела вуглецю, в кількості еквівалентній 20 г/дм^3 глюкози, додавали інулін, ксилозу, лактозу, мальтозу, маніт, крохмаль, сахарозу, фруктозу. Визначення кращих джерел азоту проводили на середовищі такого складу (г/дм^3): глюкоза – 20; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1$; $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,6$ до якого в якості джерел азоту (в еквіваленті $3 \text{ г/дм}^3 \text{ NaNO}_3$) додавали: гістидин, лейцин, лізин, триптофан, пептон, NaNO_3 , NH_4NO_3 , NaNO_2 , NH_4Cl .

Вплив рН на накопичення біомаси та екзополісахаридів визначали на сольовому середовищі з додаванням глюкози (30 г/дм³), в якому зміною концентрації КН₂РО₄ та К₂НРО₄ створювали буферні розчини з різним значенням рН – від 4,6 до 8,1 [17].

Результати та обговорення. Для отримання біологічно активних сполук, на основі яких створюються препарати різноманітного призначення, як в лабораторних, так і в промислових умовах, застосовується глибинне культивування із використанням рідких поживних середовищ, склад яких є одним з важливих факторів, що обумовлюють високий вихід цільового продукту.

На першому етапі було проведено підбір кращих джерел азоту та вуглецю. Визначення впливу різних С та N сполук на штами *S.comtine* 335, 441, 1714 та 1760 (рис. 1, 2) показало, що для росту *S.comtine* кращими джерелами вуглецю були глюкоза, гліцерин та маніт (1,54–1,65 г/дм³ в залежності від штаму), а сприятливими джерелами азоту – пептон і триптофан (1,52 та 2,65 г/дм³) та неорганічних солей – нітрат амонію (1,04–1,80 г/дм³).

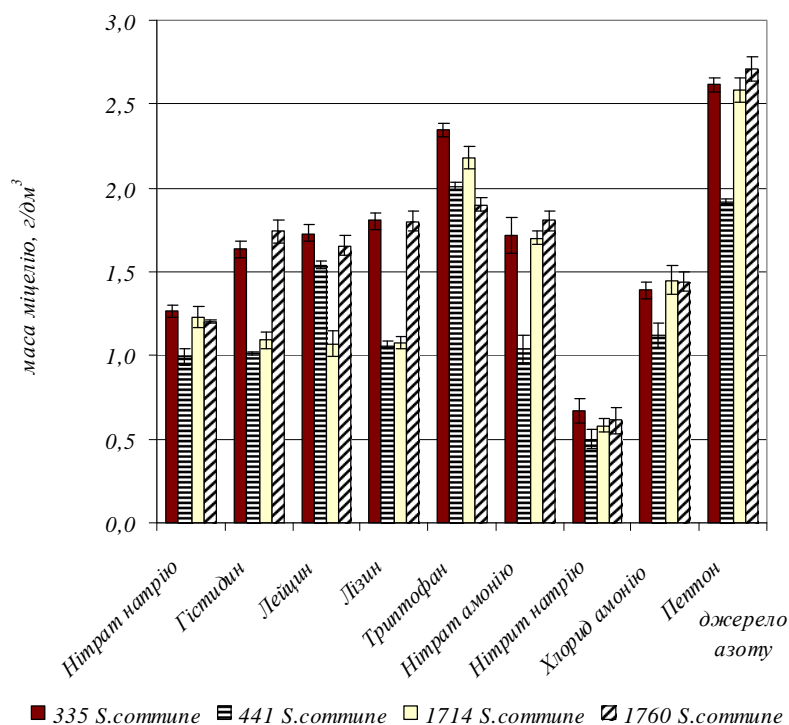


Рис. 1. Накопичення міцеліальної біомаси штамами *S.comtine* на середовищах з різними джерелами вуглецю (7 доба)

Зауважимо, що отримані дані не суперечать інформації, наведеній в літературних джерелах, тобто саме такі, як органічні, так неорганічні сполуки, найчастіше використовуються в якості джерел вуглецю та азоту для лігнотрофних вищих базидіоміцетів, в тому числі *S.comtine* [3–5, 13].

Однією з найважливіших характеристик культур є динаміка накопичення біомаси та певних цільових метаболітів. Тому, для встановлення особливостей біосинтезу екзополісахаридів та біомаси в часі, було проведено культивування штамів *S.comtine* 335, 1760 та 1761 на середовищі з 2 % глюкози та додаванням, як джерела ростових факторів, 2 % пивного сула. Виявлено, що найбільш активна (логарифмічна) фаза росту припадала для цих штамів на 24–48 год культивування, а максимальне накопичення біомаси – (9,50±0,27) г/дм³ – спостерігалось на 4–5 добу для штаму 1760.

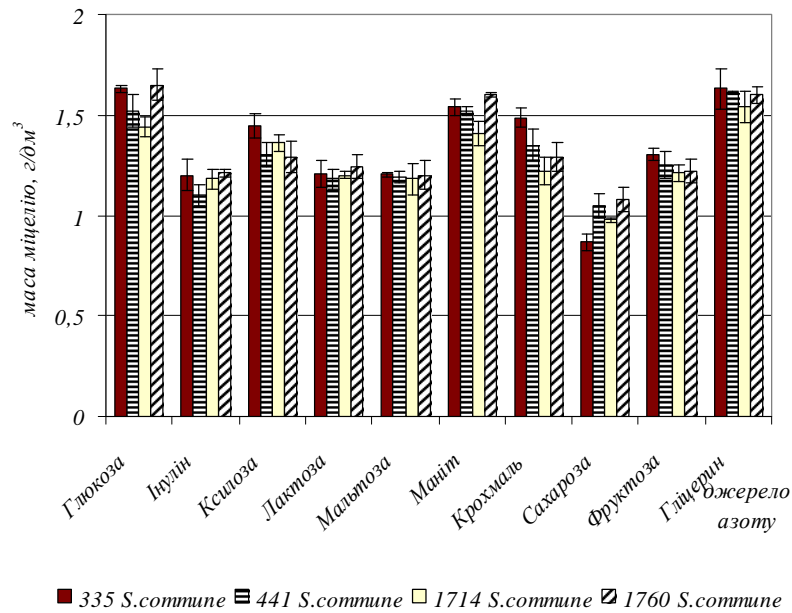


Рис. 2. Накопичення міцеліальної біомаси штамами *S. commune* на середовищах з різними джерелами вуглецю (7 доба)

Оскільки основною цільовою біологічно активною речовиною, що отримують з *S. commune* є полісахариди, то окрім біомаси було визначено динаміку його концентрації. Найбільша концентрація екзополісахаридів для *S. commune* становила $(6,06 \pm 0,14)$ г/дм³ на четверту добу культивування також у штаму 1760. (рис. 3).

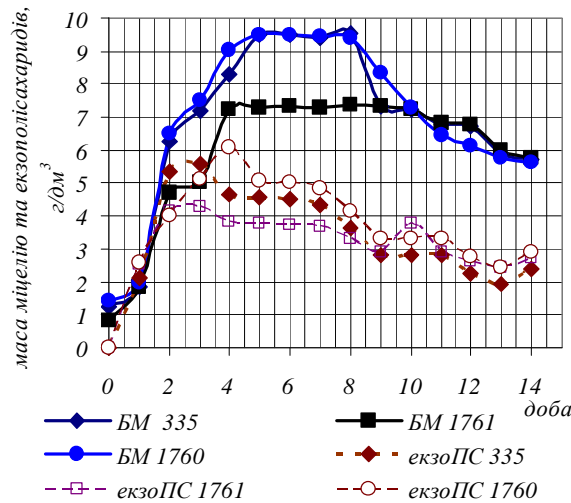


Рис. 3. Динаміка біомаси та екзополісахаридів у *Schizophyllum commune* в глибинній культурі

Одним з істотних факторів, що впливає на продукування екзополісахаридів та накопичення біомаси є співвідношення азоту та вуглецю в середовищі. Тому було проведено спробу отримати оптимізоване за цим параметром середовище для штаму 1760 *S. commune*. За результатами не вдалося розрахувати достовірну математичну модель оптимізації, тому можна стверджувати тільки про сприятливі для отримання біомаси та екзополісахаридів співвідношення азоту до вуглецю (рис. 4, 5): в досліджуваних межах для максимального накопичення біомаси концентрація глюкози – 31 г/дм³, нітрату амонію – 3 г/дм³, для максимальної кількості екзополісахаридів – 40 г/дм³ та 4 г/дм³ відповідно. Тобто, для отримання біомаси та екзополісахаридів з *S. commune*, залежно від мети

культивування необхідно дотримуватись, як різної концентрації джерел вуглецю та азоту, так і їх співвідношення – для отримання біомаси та біосинтезу екзополісахаридів необхідно C:N = 10 : 1.

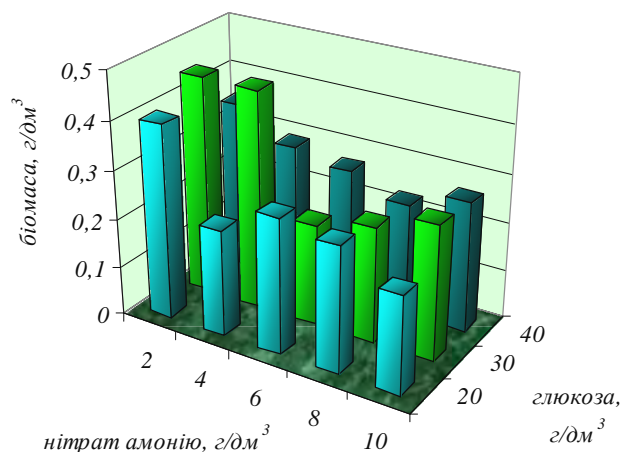


Рис. 4. Накопичення біомаси *S.commune* 1760 за різного співвідношення азоту до вуглецю у середовищі

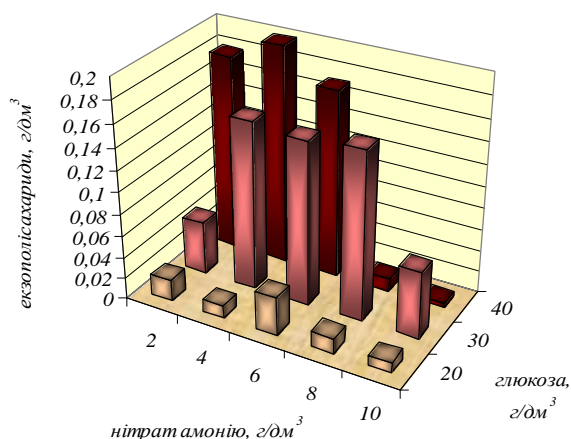


Рис. 5. Біосинтез екзополісахаридів *S.commune* 1760 за різного співвідношення азоту до вуглецю у середовищі

Ще одним фактором, який впливає на рівень продукування метаболітів та біомаси є рН середовища. Дослідження впливу кислотності на накопичення біомаси та екзополісахаридів для штамів *S.commune* 1714 та 1760 проводилися на синтетичному поживному середовищі з глюкозою (30 г/дм³), при різних вихідних значеннях рН (рис. 6). В результаті було визначено, що для отримання максимальної кількості екзополісахаридів у обох досліджуваних штамів необхідно створювати вихідне значення рН середовища близько 8,0, а для більшого виходу біомаси – 5,4.

Оскільки комплексні середовища, з одного боку, є сприятливішими для росту та отримання біологічно активних метаболітів з грибів ніж синтетичні, з іншого, є порівняно дешевими і контрольованішими та технологічнішими, то на наступному етапі досліджень визначалися особливості біосинтетичної активності та накопичення біомаси для 6 штамів *S.commune* на п'яти комплексних рідких середовищах.

В результаті, було виявлено, що найкращий ріст спостерігався у штаму *S.commune* 1760 на середовищах з КЕ та мелясою – (6,7±0,2) та (8,8±0,3) г/дм³ відповідно. Найгіршими середовищами були контрольне (без додаткових компонентів) та з суслем (рис. 7).

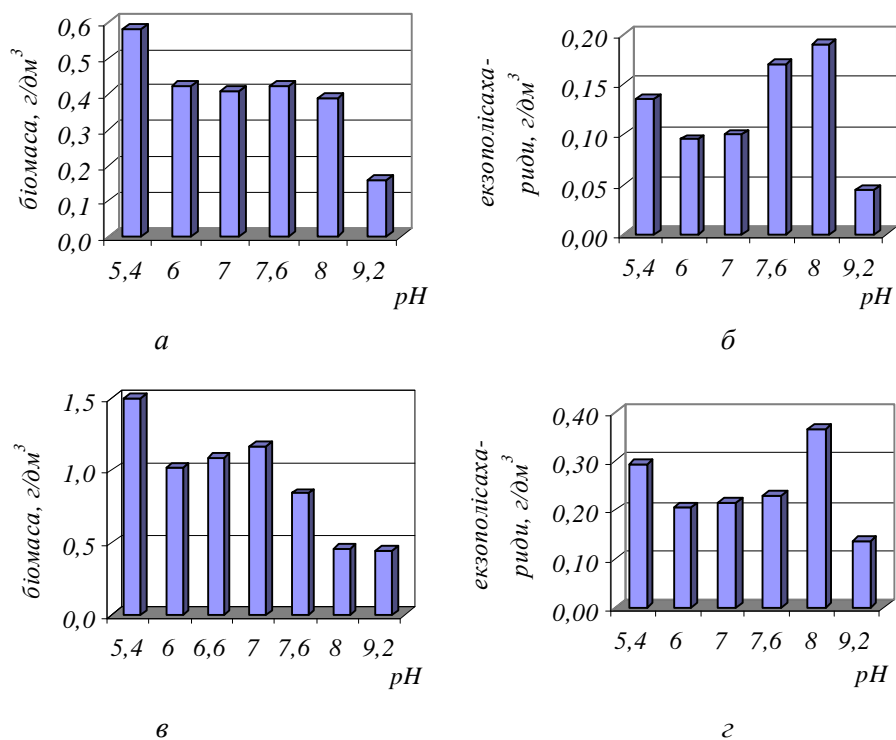


Рис. 6. Вплив рН на накопичення біомаси та екзополісахаридів:
а, б – 1714 *S.costitiae* в, г – 1760 *S.costitiae* (10 доба)

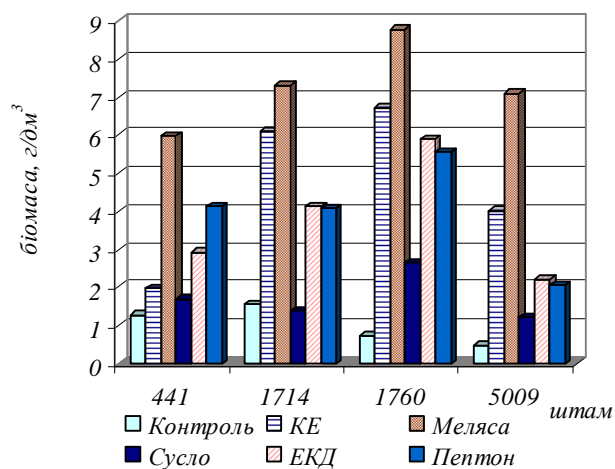


Рис. 7. Накопичення біомаси штамами *S.costitiae* на комплексних поживних середовищах (10 доба)

Визначення накопичення екзополісахаридів на комплексних поживних середовищах (рис. 8) показало, що їх максимальна кількість виявляється у штаму *S.costitiae* 1760 ($5,42 \pm 0,51$ г/дм³) на середовищі з кукурудзяним екстрактом. Найменшу активність з накопичення екзополісахаридів досліджувані штами виявляли на середовищі з глюкозою.

Для виявлення впливу компонентів комплексних середовищ на фізіолого-біохімічні властивості штамів, а також визначення ефективності споживання субстрату і умов, що цьому сприяють, було досліджено динаміку рН, білку та концентрації редуруючих речовин в середовищах.

При культивуванні на комплексних середовищах встановлено, що зміна рН залежить від вихідного значення та складу середовища і штаму (рис. 9). При цьому рН у всіх штамів не знижувалось менше за 4,0.

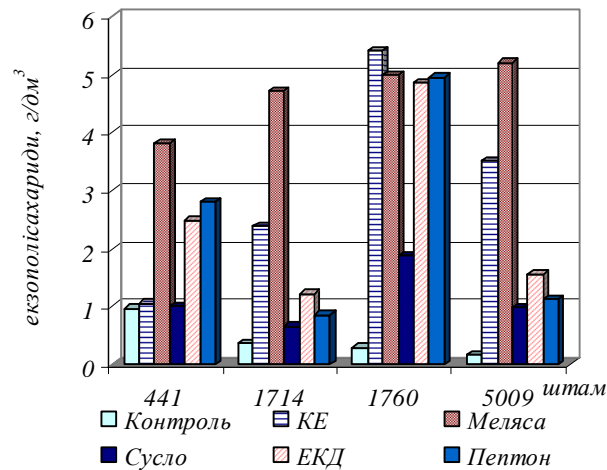


Рис. 8. Біосинтез екзополісахаридів штамами *Schizophyllum commune* на комплексних поживних середовищах (10 доба)

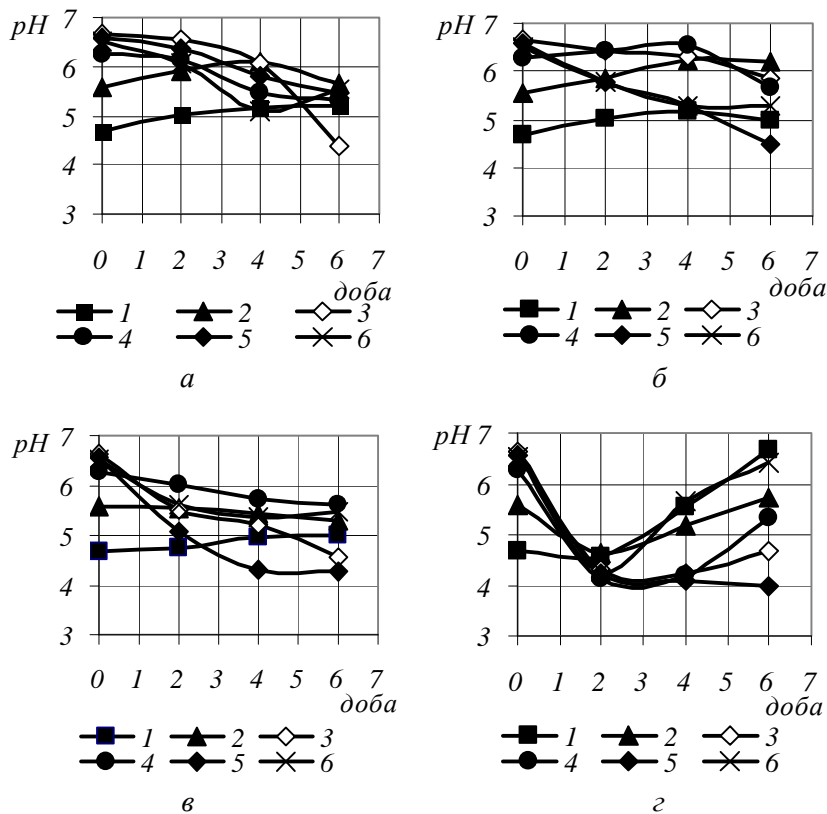


Рис. 9. Динаміка рН у штамів *S.commune* на комплексних поживних середовищах:
а – 441; б – 1714; в – 1760; г – 5009;
1 – KE; 2 – м'яса; 3 – сусло; 4 – ЕКД; 5 – контроль; 6 – пептон

Результати дослідження вмісту в культуральному фільтраті редуруючих речовин (РР) при культивуванні на комплексних поживних середовищах показали, що основними тенденціями динаміки споживання цих сполук є поступове зниження їх кількості в культуральній рідині для всіх штамів *S.commune* на всіх середовищах (рис.10). При цьому ступінь споживання редуруючих речовин на 6 добу найвищий на середовищі з суслом у 1714 та 1760 штамів (68,4 та 84,4 % відповідно), м'ясяною у 5009 і

ЕКД у 441 штамів (75,6 та 65,8 % відповідно) (табл. 1). Нерівномірне зменшення концентрації РР в середовищі, тобто деякі тимчасові збільшення вмісту РР при культивуванні штамів *S.comtine* пояснюється різним складом поживних середовищ і розкладом їх компонентів в декілька етапів, що призводить до тимчасового збільшення вмісту цукрів в середовищі.

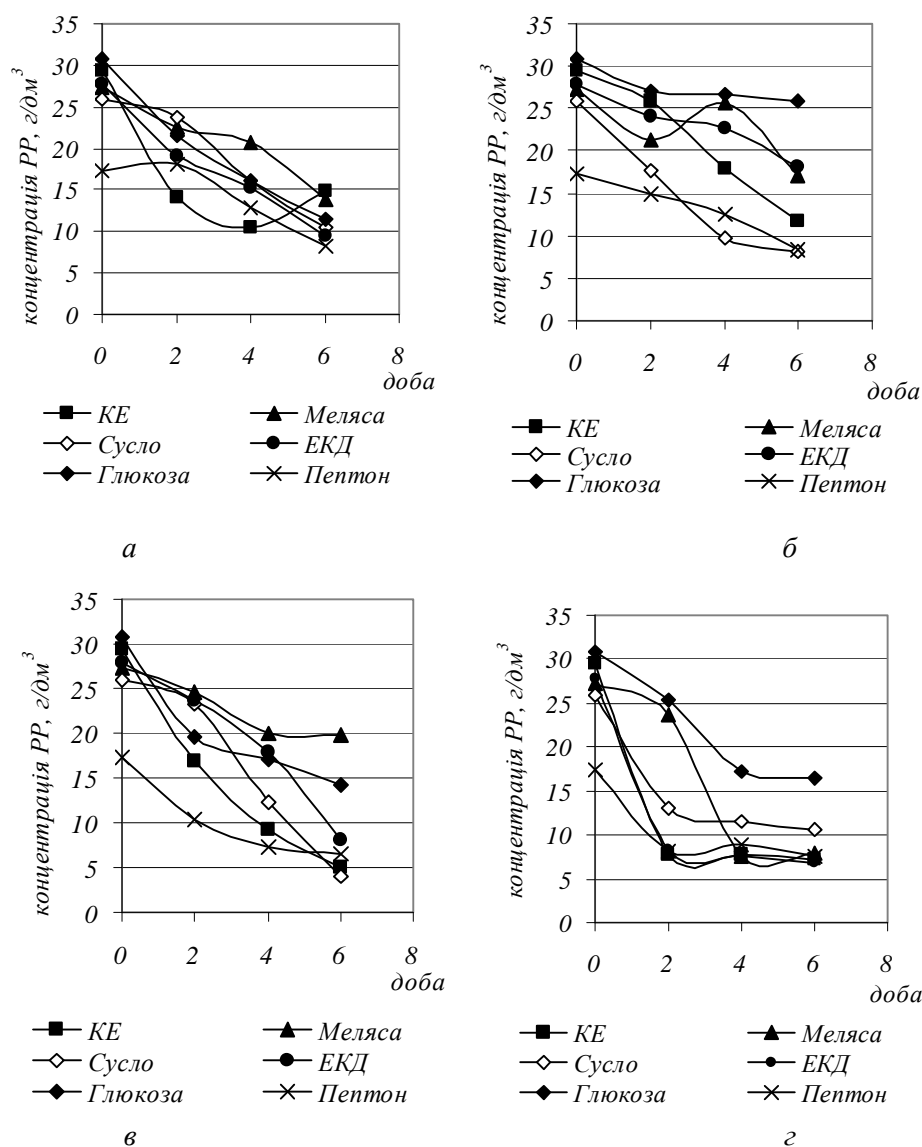


Рис. 10. Динаміка вмісту редуруючих речовин у культуральній рідині *S.comtine* на комплексних поживних середовищах:
а – 441; б – 1714; в – 1760; г – 5009

Таблиця 1

Ступінь споживання редууючих цукрів штамми *S.comtine*, %

Середовище	Штам			
	441	1714	1760	5009
KE	49,55	60,12	82,70	75,60
Меляса	49,47	37,13	27,47	70,87
Сусло	59,79	68,38	84,42	59,36
ЕКД	65,80	34,67	71,16	75,39
Пептон	52,12	52,12	62,51	56,61
Глюкоза	63,00	16,26	54,09	46,77

Одним з важливих показників фізіологічної активності культури, що характеризує як наявність екзоферментів, так і динаміку споживання компонентів поживного середовища, є вміст в культуральній рідині білку (рис. 11).

На середовищах з додаванням компонентів, що містять білок (пептон та ЕКД), у більшості штамів спостерігалось зниження його концентрації протягом перших 2–4 діб. В той же час за наявності в середовищах домішок рослинного походження вміст білку в культуральній рідині здебільшого поступово збільшувався, а після 2–4 доби культивування відбувалося зменшення його кількості. Тільки у штамів 441 та 5009 спостерігалось підвищення концентрації білку протягом перших 2–3 діб культивування на всіх досліджуваних середовищах, що ймовірно пов'язано з особливостями динаміки виділення в середовище екзоферментів. Крім того, треба зазначити, що високі результати стосовно вмісту білку на середовищах з додаванням пептону та ЕКД обумовлені складом самих середовищ.

Аналіз результатів проведених досліджень штамів *S.commune* в глибинних умовах дозволили показати вплив складу середовищ на фізіолого-біохімічні параметри гриба. Встановлення особливостей динаміки рН, білку, редукуючих речовин, активності ферментів, а також виявлення умов, що сприяють накопиченню біомаси та полісахаридів показало мінливість цих параметрів в залежності не тільки від складових компонентів середовищ, а й наявності штамових особливостей гриба.

Отже, штам *S.commune* 1760 можна запропонувати в якості продуценту, оскільки він мав найбільший рівень накопичення цільового продукту – екзополісахаридів ($(5,42 \pm 0,51)$ г/дм³ на середовищі з кукурудзяним екстрактом). Запропоновано сприятливі для нього умови культивування: рН, джерела вуглецю та азоту, додаткові компоненти (табл.2.).

Таблиця 2

Сприятливі для отримання посівного матеріалу та екзополісахаридів поживні середовища

	Середовище I для отримання посівного матеріалу, г/дм ³	Середовище II для отримання екзополісахаридів, г/дм ³
NH ₄ NO ₃	3	4
KH ₂ PO ₄		1
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O		1,34
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,5
глюкоза	30	40
кукурудзяний екстракт	-	1 %
меляса	1 %	-
вихідне рН	5,4	8,0
перемішування	180 об/хв	
температура	+30 °C	

Проведені в цих умовах культивування в колбах на 750 мл з 200 мл середовища протягом 6 діб дозволили отримати на середовищі II ($(9,02 \pm 0,28)$ г/дм³ екзополісахаридів та ($(16,1 \pm 0,4)$ г/дм³ біомаси. Вихід екзополісахаридів за біомасою становив 0,56 г/г за глюкозою – 0,23 г/г. Динаміка екзополісахаридів, біомаси та редукуючих цукрів істотно не відрізнялася від встановленої для цього штаму на інших середовищах (рис. 12).

Вихід біомаси за глюкозою у випадку застосування середовища I – 0,59 г/г, що становило $17,84 \pm 0,62$ г/дм³.

Також було проведено культивування в ферментері з робочим об'ємом 3 л, механічним перемішуванням 180 об/хв, аерацією стерильним повітрям 5 л/хв, контролем температури ($+30 \pm 0,5$ °C), тривалістю 5 діб. Використовувалось середовище II. В результаті біосинтезу було отримано ($(10,04 \pm 0,61)$ г/дм³ екзополісахаридів, ($(18,11 \pm 0,13)$ г/дм³ біомаси. Ступінь споживання редукуючих речовин становив 71 %.

Отримані дані дозволили запропонувати технологію виробництва екзоклітинного полісахариду – шизофілану, з використанням вітчизняного штаму-продуценту *S.comtipe*

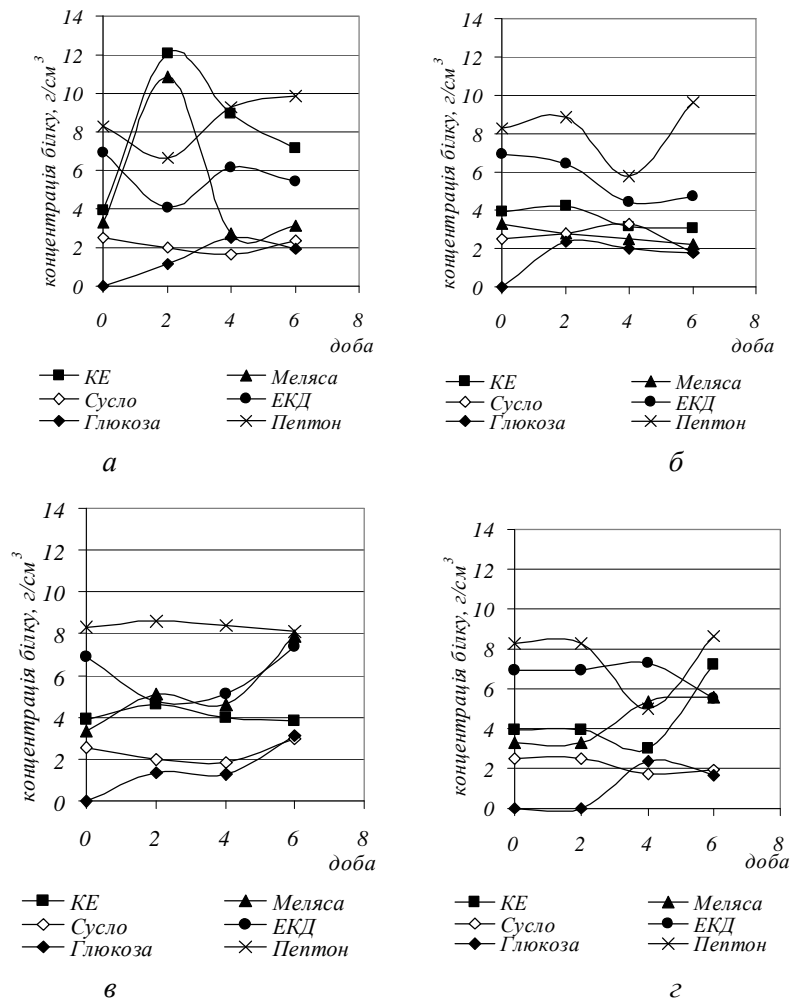


Рис. 11. Динаміка вмісту білку в культуральній рідині *S.comtipe* на комплексних поживних середовищах: а – 441, б – 1714, в – 1760, г – 5009

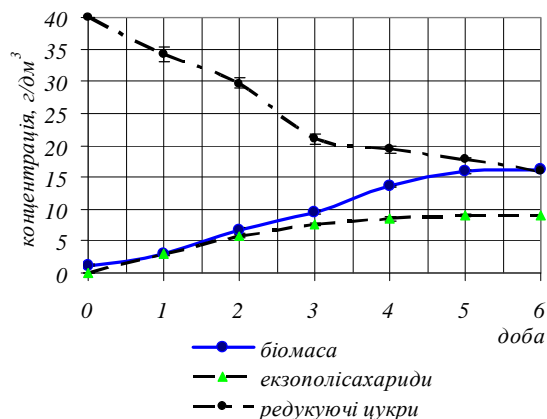


Рис. 12. Динаміка концентрації міцеляльної біомаси, редуруючих речовин та екзополісахаридів в культуральній рідині *S.comtipe* на оптимальному середовищі

Висновки. 1. У результаті проведених досліджень вищого базидіального гриба *Schizophyllum comtipe* на рідких середовищах різного складу встановлено закономірності росту і біосинтетичної активності та умови, сприятливі для накопичення екзополісахаридів.

2. Визначено кращі для *S.commune* джерела вуглецю – глюкоза, гліцерин та маніт (1,54-1,63 г/дм³ в залежності від штаму) та азоту – пептон, триптофан та з неорганічних сполук – нітрат амонію (1,92-2,71 г/дм³, 1,90-2,35 г/дм³ та 1,04-1,71 г/дм³ відповідно). Також встановлено співвідношення азоту та вуглецю в середовищі – для максимального накопичення біомаси концентрація глюкози – 30 г/л, нітрату амонію – 3 г/л, для максимальної кількості екзополісахаридів – 40 г/л та 4 г/л відповідно.

3. Визначено, що для отримання максимальної кількості екзополісахаридів у обох досліджуваних штамів необхідно створювати вихідне значення рН середовища 8,0, а для більшого виходу біомаси – 5,4.

4. На комплексних середовищах найбільший рівень накопичення біомаси виявився у штаму *S.commune* 1760 на середовищах з КЕ та мелясою – (6,7±0,2) та (8,8±0,3) г/дм³ відповідно. Найгіршими середовищами були контрольне (без додаткових компонентів) та з суслом. Визначення накопичення екзополісахаридів на комплексних поживних середовищах показало, що їх максимальна кількість виявляється у штаму *S.commune* 1760 ((5,42±0,51) г/дм³) на середовищі з кукурудзяним екстрактом.

5. Встановлено, що динаміка концентрації РР, білку та рН в культуральному фільтраті *S.commune* при культивуванні на комплексних середовищах залежать, в першу чергу, від складу середовища та пов'язані з наявністю речовин-індукторів та хімічною природою сполук, що є джерелами вуглецю для гриба. При цьому ступінь споживання редуруючих речовин на 6 добу найвищий на середовищі з суслом у 1714 та 1760 штамів (68,4 та 84,4 % відповідно), мелясою у 5009 і ЕКД у 441 штамів (75,6 та 65,8 % відповідно)

6. Запропоновано комплексні поживні середовища з КЕ і мелясою та розроблено технологію отримання екзополісахариду шизофілану та біомаси з використанням штамів-продуцентів *G.fruondosa* 1790 та *S.commune* 1760, що дає змогу отримувати достатньо високий рівень екзополісахаридів та біомаси (3,27±0,48) г/дм³ екзополісахаридів і (8,42±0,52) г/дм³ біомаси та (9,02±0,2)8 г/дм³ екзополісахаридів та (16,1±0,4) г/дм³ біомаси, відповідно.

1. Wasser S.P. Medicinal mushrooms: ancient traditions, contemporary knowledge and scientific enquiries / S.P. Wasser // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2007. – Vol. 9. – № 3/4. – P. 187–188. 2. Lindequist U. The Pharmacological Potential of Mushrooms / U. Lindequist, T.H.J. Niedermeyer, W.-D. Julich // *eSAM*. – 2005. – Vol. 2. – № 3. – P. 285–299. 3. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С.Бухало. – Киев: Наукова думка, 1988. – 144 с. 4. Бухало А.С. Скрининг штаммов лекарственных макромицетов в коллекции культур шляпочных грибов / А.С. Бухало, Н.Л. Поединок, О.Б Михайлова., М.Л. Ломберг // *Успехи медицинской микологии*. – Т. 9. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – (376 С.), С. 227-230. 5. Гвоздкова Т.С. Оценка возможности использования базидиальных грибов в качестве источников биоактивных липидных компонентов / Т.С. Гвоздкова, Т.В Черноок., Т.В. Филимонова, З.А. Рожкова, О.В. Осадчая, Д.А. Смирнов, В.В. Щерба, В.Г. Бабицкая // *Успехи медицинской микологии*. – Т. 9 – М.: Национальная академия микологии, 2007. – (376 С.), С. 151–154. 6. Yassin M. Submerged cultured mycelium extracts of higher basidiomycetes mushrooms selectively inhibit proliferation and induce differentiation of K562 human chronic myelogenous leukemia cells / M., Yassin J.A. Mahajana, S.P. Wasser // *Int. J. Med. Mushr.* - 2003. – Vol. 5. - P. 261–276. 7. Ooi V. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides // *Int. J. Med. Mushr.* – 1999. – Vol. 3. – P. 361–394. 8. Rice P.J. Pharmacokinetics of fungal (1–3)-β-D-glucans following intravenous administration in rats / P.J. Rice, B.E. Lockhart, L.A. Barker, E.L. Adams, H.E. Ensley, D.L. Williams // *Int. Immunopharmacol.* – 2004. – Vol. 4, № 9. – P. 1209–1215. 9. Suzuki T. Synergistic action of beta-glucan and platelets on interleukin-8 production by human peripheral blood leukocytes / T. Suzuki, A. Tsuzuki, N. Ohno, Y. Ohshima, Y. Adachi, T. Yadomae // *Biol Pharm Bull.* – 2002. – Vol. 25. – № 1. – P. 140–144. 10. Sugiyama T. Combination treatment with cisplatin and schizophyllan for 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat ovarian adenocarcinoma / T. Sugiyama, T. Nishida, S. Kumagai, K. Imaishi, K. Ushijima, A. Kataoka, M. Yakushiji // *J. Obstet. Gynaecol.* – 1995. – Vol. 21, №5. –

P. 521–527. 11. Ross G. *Therapeutic intervention with complement and b-glucan in cancer* / G. Ross, V. Vetvicka, Y. Xia, J. Vetvickova // *Immunopharmacology* – 1999. – Vol. 42. – P. 61–74. 12. Kubala L. *The effect of (1→3)-β-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro* / L. Kubala, J. Ruzickova, K. Nickova, J. Sandula, M. Ciz, A. Lojek // *Carbohydr. Res.* – 2003. – Vol. 338, № 24. – P. 2835–2840. 13. *Методы экспериментальной микологии. Справочник* // [Дудка И.А., Вассер С.П., Эланская И.А. и др.] – К.: Наук. думка, 1982. – 561 с. 14. *Изделия кондитерские. Методы определения сахара ГОСТ 5903-89.* [Введен 1991-01-01]. – М.: Государственный агропромышленный комитет СССР 1989. – 23 с. – (Межгосударственный стандарт). 15. Кочетов Г.А. *Практическое руководство по энзимологии: учеб. пособ. для студентов биологических специальностей университетов* / Г.А.Кочетов. – М.: Высш. шк., 1992. – 352 с. 16. Варбанец Л.Д. *Методы исследования эндотоксинов* / Л.Д. Варбанец, Г.М. Здоровенко, Ю.А. Книрель. – К.: Наук. думка, 2006. – 238 с. 17. Рабинович В.А. *Краткий химический справочник* / В.А. Рабинович, З.Я. Хавин. – Л.: Химия, 1977. – 379 с.