

УДК 579.66

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УТИЛИЗАЦИИ ПОСЛЕЭКСТРАКЦИОННОЙ БИОМАССЫ И КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *ORTHILIA SECUNDA* (L.) HOUSE БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

© Ж.А. Кох^{1,2*}, Ю.А. Литовка^{1,3}, Р.Х. Эназаров¹, П.В. Маколова¹, Ю.С. Шимова³, И.С. Почекутов³,
И.Н. Павлов^{1,3}

¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 (Россия),
e-mail: jannetta-83@mail.ru

² Красноярский государственный аграрный университет, пр. Мира, 90,
Красноярск, 660049 (Россия)

³ Сибирский государственный университет науки и технологий имени
академика М.Ф. Решетнёва, пр. Мира, 82, Красноярск, 660049 (Россия)

Исследована возможность биоконверсии после экстракционного остатка лекарственного растения *Orthilia secunda* (исходное сырье и каллусная ткань после извлечения биологически активных веществ) быстрорастущими штаммами базидиальных грибов Tv2-16K *Trametes versicolor* и Pe-17T *Pleurotus eryngii* для получения мицелиально-растительного продукта (со сниженным содержанием трудноперевариваемой фракции и обогащенного белком) и полноценных плодовых тел. Грибные культуры колонизируют растительные отходы с радиальной скоростью роста 2.0–2.3 мм/сут и ростовым коэффициентом 65–77 ед. Фенолоксидазная активность составляет 0.7–1.2 ед/г·с в зависимости от типа после экстракционного остатка. В субстратах после биодеструкции доля трудногидролизующих полисахаридов, легкогидролизующих полисахаридов и лигнина в среднем в 1.6 раз ниже по сравнению с исходными значениями. Содержание белка и экстрактивных веществ существенно выше, особенно на после экстракционном остатке каллусной ткани *O. secunda* под действием штамма Tv2-16K *T. versicolor*: соответственно 12.8 и 24.3% от массы а.с.с. Получены плодовые тела штамма Pe-17T *P. eryngii* на различных композициях растительных субстратов. Максимальное плодообразование отмечено на четырехкомпонентных субстратах, содержащих два типа после экстракционных остатков *O. secunda*, пшеничные отруби, опилки березы или осины. Средняя масса плодовых тел с одного блока составила 230–236 г; биологическая эффективность процесса – 46–47.2%.

Ключевые слова: биодеструкция, базидиомицеты, твердофазное культивирование, после экстракционный остаток, каллусная ткань, *Orthilia secunda*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes versicolor*.

Введение

Лекарственные растения имеют достаточно обширный ареал и синтезируют разнообразный спектр биологически активных веществ, что обуславливает их широкое применение в медицине, пищевых технологиях и парфюмерно-косметической промышленности. Растительное сырье подвергается технологической обработке на специализированных предприятиях, характерной особенностью которых является накопление значительного количества отходов лекарственных растений после извлечения биологически ценных суб-

Кох Жанна Александровна – кандидат технических наук, научный сотрудник, доцент кафедры технологии, оборудования бродильных и пищевых производств, тел. (391)247-26-66, e-mail: jannetta-83@mail.ru

Литовка Юлия Александровна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, профессор кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: litovkajul@rambler.ru

станций, поскольку производственный процесс не является замкнутым. В настоящее время проблема утилизации отходов растительного происхождения для предприятий, специализирующихся на производстве фармацевтического сырья, является весьма актуальной. Одним из наиболее распространенных подходов является заделывание растительных

Окончание на С. 360.

* Автор, с которым следует вести переписку.

остатков в почву. Помимо этого, отходы можно использовать в технологиях силосования, кормопроизводства и компостирования, а также при получении биогумуса и белково-углеводных продуктов на основе грибной биомассы [1, 2].

Вегетативная часть *Orthilia secunda* L. (Ericaceae) широко используется в качестве сырья для производства лечебных и профилактических препаратов, например, в качестве диуретиков и антисептиков при воспалении органов мочевыводящей системы. Растение имеет циркумбореальное распространение и встречается на большей части Северного полушария, преимущественно, в хвойных лесах и на скальных выступах с повышенным уровнем влажности. Вегетативная часть *O. secunda* богата дубильными веществами, флавоноидами, камедью, лимонной и винной кислотами, арбутином и сапонинами. После сбора и первичной переработки сырье (стебли, листья и цветы) подвергают экстрагированию для получения целевых продуктов. После экстракционный остаток растительного сырья целесообразно повторно вовлечь в производственный цикл, сделав его практически безотходным для производства белково-углеводных кормовых продуктов и/или плодовых тел базидиомицетов методами твердофазной ферментации [2].

Высшие базидиальные ксилотрофные грибы привлекают внимание исследователей не только как агенты процессов биодеструкции растительных отходов, но и как продуценты уникального комплекса биологически активных веществ. Мицелий и плодовые тела многих представителей базидиомицетов характеризуются высокой питательной ценностью, отличными вкусовыми и разнообразными лекарственными свойствами. В состав грибной биомассы входят витамины и гликозиды, используемые для производства противоопухолевых, гепатопротекторных, иммуномодулирующих и антиоксидантных препаратов. Способность ксилотрофных базидиомицетов эффективно разрушать лигноцеллюлозные субстраты (отходы агро- и лесопромышленного комплексов, пищевой и фармацевтической промышленности) открывает широкие возможности использования их биотехнологического потенциала для переработки и утилизации разнообразных растительных отходов с получением целевых продуктов в виде биомассы грибов или их метаболитов [3–7].

Дереворазрушающие грибы рода *Pleurotus* (Вешенка) – это одни из наиболее исследуемых и культивируемых на различных растительных субстратах базидиомицетов, в том числе виды *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, *P. citrinopileatus* Singer, *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland, *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, *P. eryngii* (DC.) QuéL., *P. pulmonarius* (Fr.) QuéL., *P. sapidus* QuéL. и др. Лидирует по объемам мирового промышленного производства вид *P. ostreatus* (второе место после *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach), тем не менее в странах Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока предпочитают употреблять в пищу *P. eryngii*, что обуславливается его высокой питательной ценностью и продуктивностью, вкусовыми качествами и эстетичным видом плодовых тел [8–11]. В ряде работ представлены результаты твердофазного культивирования *P. eryngii* на различных комбинациях растительных субстратов с последующей оценкой биологической эффективности процесса. Показана возможность эффективного плодообразования *P. eryngii* на пяти вариантах растительных субстратов, основой которых является вегетативная часть *Caragana korshinskii* с добавлением опилок, жмыха сахарного тростника, хлопковой шелухи, кукурузы, пшеничных отрубей, маиса и соевой муки. Первая волна плодоношения наступала на 68–72 сутки; масса плодовых тел с одного субстратного

Эназаров Рустам Хамиджанович – младший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и биотехнологии, e-mail: rusya955@mail.ru
Маколова Полина Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии, e-mail: polinochka-makolova@rambler.ru
Шимова Юлия Сергеевна – кандидат химических наук, доцент кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: shimovays@sibsau.ru
Почекотов Иван Сергеевич – кандидат технических наук, доцент кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: pochekutovic@sibsau.ru
Павлов Игорь Николаевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией лесных культур, микологии и фитопатологии, заместитель директора по научной работе, заведующий кафедрой химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: forester24@mail.ru

блока варьировала от 203 до 247 г; биологическая эффективность культивирования составила 59–71%. Максимальная продуктивность зафиксирована для комбинации субстратов с наибольшим содержанием порошка караганы [12]. В исследовании [13] отмечается возможность использования смеси тополевых опилок и семян хлопчатника в качестве субстрата для получения плодовых тел *P. eryngii*. При использовании девяти растительных компонентов биологическая эффективность варьировала от 67 до 236% в зависимости от их комбинации. Наибольшее количество биомассы *P. eryngii* на килограмм субстрата отмечено при сочетании рисовых отрубей и мякоти сахарной свёклы (2363 г·кг⁻¹) [14].

Оценка возможности применения малоценных агропромышленных отходов (хлопковая шелуха, курузные початки, пшеничная и рисовая солома, жмых сахарного тростника, опилки) в виде моноsubstrатов для твердофазного культивирования показала, что зарастание субстратных блоков с момента инокуляции составило 32–39 сут; масса плодовых тел *P. eryngii* с одного блока – 99–200 г; биологическая эффективность культивирования – 36–72%. Максимальные показатели продуктивности зафиксированы при ферментации хлопковой шелухи, наименьшие – для опилок [15]. Результаты еще одного исследования свидетельствуют о более высокой продуктивности *P. eryngii* на хлопковой шелухе: масса плодовых тел с субстратного блока составила 280–290 г, биологическая эффективность процесса – 72% [16]. При культивировании *P. eryngii* на таких моноsubstrатах, как дубовые опилки, бобовая солома и подсолнечная шелуха, время зарастания субстратных блоков варьировало от 20 до 24 сут; образование примордиев зафиксировано на 31–43 сут; первая волна плодоношения наступала спустя 38–50 сут с момента инокуляции. Биомасса плодовых тел с одного субстратного блока составила 140–234 г; биологическая эффективность процесса – 47–73% [17]. Отмечается возможность использования в качестве моноsubstrатов стеблей кенафа и рами, для которых были получены следующие показатели: биомасса на 300 г влажного субстрата – 157 и 153 г; биологическая эффективность процесса – 52 и 51% соответственно [18], а также оливы и виноградных выжимок [19, 20]. Таким образом, несмотря на то, что традиционным субстратом культивирования грибов рода *Pleurotus* являются пшеничная или рисовая солома, плодообразование с высокой биологической эффективностью возможно на разнообразных лигноцеллюлозных субстратах, включая после экстракционные остатки растительного сырья [21–24].

Еще одним перспективным базидиомицетом для биодеструкции растительных отходов является *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (трутовик разноцветный), характеризующийся повсеместным распространением, высокими ростовыми показателями, синтезом комплекса высокоактивных внеклеточных лигнолитических и целлюлолитических ферментов (применяются в виноделии, пивоварении, целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности, биоремедиации) и биологически активных веществ, в том числе с антиопухоловой активностью [25, 26]. Многочисленными исследованиями показана возможность глубинного и твердофазного культивирования *T. versicolor* на средах с растительными отходами для получения внеклеточных ферментов и биологически активных веществ. Выявлена максимальная активность лакказы ($1587 \text{ ед} \cdot \text{л}^{-1}$) на среде, содержащей барду и воду в соотношении 1 : 7, а также 1% хлопковой шелухи [27]. Показана возможность культивирования *T. versicolor* на пшеничных отрубях с добавлением кукурузной / рисовой соломы, кукурузных кочерыжек, опилок и жома для высокой продуктивности лакказы. Максимальные показатели отмечены на субстратах с добавлением кукурузной соломы ($32.1 \text{ ед} \cdot \text{г}^{-1}$) и жома ($22.3 \text{ ед} \cdot \text{г}^{-1}$) [28]. При использовании отходов чайного производства для твердофазного культивирования *T. versicolor* выход фермента составил $25.7 \text{ ед} \cdot \text{г}^{-1}$ [29]. Высокие показатели активности лакказы отмечены на таких субстратах как листья партениума позднеплодного и сахарного тростника, а также на соломе пшеницы и риса – 185, 165, 150 и 145 $\text{ед} \cdot \text{г}^{-1}$ соответственно [30]. Показана возможность использования кукурузного силоса в качестве сырья для получения лакказы и Mn-пероксидазы при жидкофазном культивировании *T. versicolor*, а также для производства кофейной, ванильной, гидроксibenзойной и сиреневой кислоты при твердофазной ферментации [31]. Установлено, что тип растительного субстрата оказывает влияние на содержание эргостерола в плодовых телах *T. versicolor*: на зерновом субстрате выход эргостерола оказался в 6–12 раз выше по сравнению с пшеничной соломой, рисовой шелухой и жмыхом сахарного тростника [32].

Таким образом, базидиальные грибы *P. eryngii* и *T. versicolor* широко используются в процессах биоconversion отработанных лигноцеллюлозных растительных субстратов с получением целевых продуктов в виде грибной биомассы и биологически активных продуктов метаболизма. Широкий спектр используемых растительных отходов и высокие экономические показатели твердофазной ферментации обусловлены неприхотливостью этих представителей базидиомицетов, высокими ростовыми параметрами и синтезом широкого спектра ферментов, осуществляющих эффективную деполимеризацию трудногидролизуемых полисахаридов и делигнификацию. Настоящее исследование было проведено с целью определения целесообразности использования после экстракционного остатка растительного сырья и каллусной ткани *O.secunda* в качестве субстрата для твердофазного культивирования, в том числе для получения плодовых тел съедобного гриба *P. eryngii* и растительно-мицелиальных продуктов на основе лекарственного гриба *T.versicolor*.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили штаммы макроскопических базидиальных грибов Tv2-16K *Trametes versicolor* (L.) Lloyd и Pe-17T *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél., изолированные в чистую культуру из соответствующих базидиом методом накопления во влажной камере с последующим пересевом на агаризованные среды [33]. В качестве ростовых субстратов для культивирования базидиомицетов использовали после экстракционные остатки исходного сырья и каллусной ткани *Orthilia secunda* (L.) House. после извлечения биологически активных веществ. Культуральные особенности штаммов исследовали на мальт-экстракт агаре (МЭА) (рис. 1А) и растительных субстратах (рис. 1В) при 24 ± 1 °С; микроструктуры – методами светопольной микроскопии (Nikon Eclipse Ci, Япония) в микрокамерах [33]. Видовую идентификацию подтверждали секвенированием участков генетических маркеров ITS и TEF-1alpha с использованием оборудования ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Индексы общей ферментативной активности грибов определяли экспресс-методом на агаризованных питательных средах: среда Чапека-Докс с 1% Na-КМЦ с использованием красителя конго-красный (индекс целлюлазной активности) [34] и мальт-экстракт агар с 0.5% танина (индекс оксидазной активности) (рис. 1Б) [33].

Твердофазное культивирование осуществляли на двух типах растительных субстратов (рис. 1Г, Д), которые являются отходом после извлечения биологически активных веществ одноступенчатой экстракцией 40% раствором этилового спирта: 1. после экстракционный остаток исходного сырья *O. secunda* с размером частиц 2.5 мм; 2. после экстракционный остаток каллусной ткани *O. secunda* в виде шрота с размером частиц около 1 мм. Растительное сырье высушивали до воздушно-сухого состояния, увлажняли водопроводной водой и стерилизовали при 115 °С в течение 30 мин. Условия твердофазного культивирования: влажность субстратов 70%; температура 25 ± 1 °С; длительность культивирования 20 сут. Определяли ростовые параметры грибов (радиальная скорость роста, СР; ростовой коэффициент, РК) [35], активность фенолоксидазы в системе пирокатехин-р-фенилендиамин [36], а также химический состав растительных субстратов до и после биодеструкции: содержание протеина – методом Бузуна [37]; экстрактивных веществ – гравиметрическим методом [38]; суммарного количества полисахаридов – методом Вознесенского [38]; лигниновых веществ – модифицированным методом Комарова [39]; зольных веществ – спектрофотометрическим методом [40].

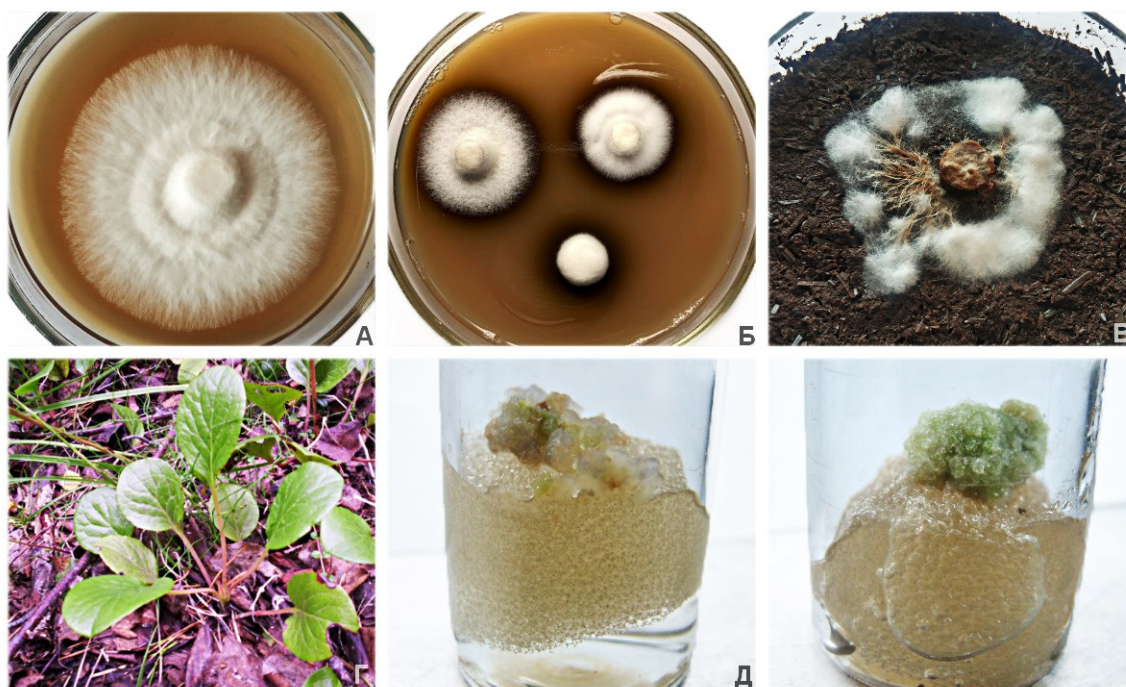


Рис. 1. Морфология колоний базидиальных грибов *Trametes versicolor* (А, В), *Pleurotus eryngii* (Б) на ростовых субстратах; внешний вид *Orthilia secunda* in situ (Г); каллусная ткань *Orthilia secunda* in vitro (Д)

Для исследования возможности плодобразования *in vitro* штамма Pe-17T *P. eryngii* провели его твердофазное культивирование на нескольких комбинациях растительных субстратов, включающих послеэкстракционные остатки *O. secunda* (исходное сырье и каллусная ткань), березовые и осиновые опилки, пихтовую щепу и пшеничные отруби (20% во всех вариантах). Влажность субстрата после стерилизации составила 68%; pH 5.9. Для поддержания буферности и во избежание слипания растительных компонентов в субстрат добавляли 1%-е растворы $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и CaCO_3 . В качестве инокулюма использовали зерновой мицелий штамма Pe-17T в количестве 5% от объема растительного субстрата. Культивирование осуществляли в стерильных пластиковых контейнерах объемом 1 л при 25 ± 1 °C в течение 30–35 сут без освещения до максимального зарастания субстрата мицелием. Далее для стимулирования плодобразования температуру понижали до 16 °C; освещенность составила 300–400 люкс с 12-часовым фотопериодом; влажность воздуха 95%. Основные оцениваемые показатели – длительность зарастания субстрата (сут); начало массовой закладки зачатков плодовых тел (примордиев) (сут); сырая масса плодовых тел (г) и биологическая эффективность (%) – показатель, характеризующий отношение сырой биомассы плодовых тел грибов к сухой массе субстрата [33].

Обсуждение результатов

Одним из ограничений широкого использования базидиальных грибов в биотехнологических производствах являются их невысокие скорости роста и необходимость строгого соблюдения правил асептики вследствие стремительной контаминации культуры-продуцента быстрорастущей конкурентной микрофлорой. Используемые в данном исследовании штаммы характеризуются относительно высокими для базидиомицетов ростовыми параметрами *in vitro* на агаризованных средах (табл. 1), используемых для получения инокулята и последующего твердофазного культивирования.

Максимальные ростовые показатели отмечены у штамма Tv2-16K *T. versicolor* на мальт-экстракт агаре – радиальная скорость 6.1 мм / сут, ростовой коэффициент 83. Индекс оксидазной активности составил 6.1; целлюлазной активности – 3.3. Оба исследуемых штамма на МЭА с добавлением танина и без него характеризуются как растущие со средней скоростью, синтезируют комплекс целлюлолитических и лигнолитических ферментов, при этом индекс оксидазной активности существенно выше.

В ходе твердофазного культивирования грибов на после экстракционных остатках исходного сырья и каллусной ткани *O. secunda* отмечена активная колонизация обоих субстратов. Радиальная скорость роста была ниже, чем на МЭА (2.0–2.3 мм/сут), однако ростовые коэффициенты, характеризующие степень адаптации культуры к субстрату, были сопоставима (65–77) – штаммы на растительных субстратах проявили себя, как растущие со средней скоростью, что является хорошим показателем для базидиомицетов. На рисунке 2 представлена динамика прироста колонии *T. versicolor* и *P. eryngii* на двух типах растительных субстратов; длительность колонизации составила 16–18 сут; период наиболее активного роста отмечен с 11-е по 18-е сут. Ростовые показатели и активность фенолоксидазы каждого штамма на двух субстратах отличались не существенно (табл. 2). Максимальные ростовые показатели и ферментативная активность отмечены для штамма Tv2-16K *T. versicolor*: радиальная скорость роста составила 2.3 и 2.2 мм/сут, ростовой коэффициент – 77 и 75, активность фенолоксидазы – 1.2 и 1.0 ед/г·с соответственно при культивировании на после экстракционном остатке исходного сырья и каллусной ткани.

Таблица 1. Ростовые параметры и индексы ферментативной активности штаммов Tv2-16K *Trametes versicolor* и Pe-17T *Pleurotus eryngii* на агаризованных питательных средах

Вид	Мальт-экстракт агар	Мальт-экстракт агар с 0.5% танина		Среда Чапека-Докс с 1% Na-КМЦ	
		Ростовые параметры	Индекс оксидазной активности	Ростовые параметры	Индекс целлюлазной активности
<i>Trametes versicolor</i>	<u>6.1±0.31</u>	<u>5.7±0.22</u>	6.1±0.12	<u>2.9±0.13</u>	3.3±0.08
	83	67		46	
<i>Pleurotus eryngii</i>	<u>4.0±0.17</u>	<u>3.5±0.31</u>	5.5±0.19	<u>2.1±0.11</u>	2.9±0.01
	71	57		41	

*скорость роста (мм/сут); **ростовой коэффициент.

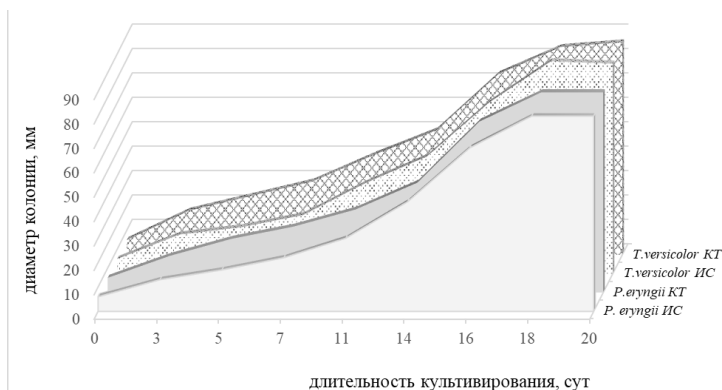


Рис. 2. Динамика радиального роста колоний *Trametes versicolor* и *Pleurotus eryngii* на послеэкстракционных остатках исходного сырья (ИС) и каллусной ткани (КТ) *Orthilia secunda*

Таблица 2. Ростовые параметры и активность фенолоксидазы штаммов Tv2-16К *Trametes versicolor* и Pe-17Т *Pleurotus eryngii* на послеэкстракционных отходах *Orthilia secunda*

Вид	Ростовые показатели		Активность фенолоксидазы, ед/г·с	
	послеэкстракционный остаток исходного сырья	послеэкстракционный остаток каллусной ткани	послеэкстракционный остаток исходного сырья	послеэкстракционный остаток каллусной ткани
<i>Trametes versicolor</i>	2.3 ± 0.08 77	2.2 ± 0.12 75	1.2 ± 0.12	1.0 ± 0.09
<i>Pleurotus eryngii</i>	2.0 ± 0.18 65	2.1 ± 0.12 67	0.9 ± 0.07	0.7 ± 0.08

*скорость роста (мм / сут); **ростовой коэффициент.

Таким образом, с точки зрения ростовых характеристик грибов и активности фермента, участвующего в процессе делигнификации, исследуемые отходы лекарственного сырья после извлечения биологически активных веществ являются пригодными для твердофазного культивирования *T. versicolor* (рис. 3А, Б) и *P. eryngii*. Для оценки трофических предпочтений и степени биодеструкции субстратов базидиальными грибами дополнительно исследовали биохимический состав после экстракционных остатков до и после культивирования. Данные представлены в таблице 3.

Установлено, что послеэкстракционный остаток исходного сырья и каллусной ткани *O. secunda* имеет близкий химический состав, за исключением экстрактивных веществ, содержание которых в 1.8 раза выше в исходном сырье по сравнению с каллусной тканью. В значительном количестве присутствуют полисахариды (61.3 и 61.8% соответственно) и лигнинные вещества (27.3 и 30.7%), которые являются благоприятным ростовым субстратом для исследуемых дереворазрушающих грибов.

При культивировании базидиомицетов на послеэкстракционном остатке исходного сырья *O. secunda* общая направленность биохимических изменений субстрата была схожей, однако более глубокие превращения отмечены под действием штамма Tv2-16К *T. versicolor*. Содержание ТПП, ЛПП и лигнинных веществ в среднем уменьшилось в 1.3; 1.4 и 1.7 раз соответственно. В субстрате, биодеструктированном разноцветным трутовиком, отмечено существенное увеличение белка и экстрактивных веществ – в 9.6 и 3.3 раза соответственно. Аналогичные изменения химического состава происходили на послеэкстракционном остатке каллусной ткани *O. secunda*; максимальной активностью также характеризуется штамм Tv2-16К *T. versicolor*. Содержание ТПП, ЛПП и лигнина уменьшилось по сравнению с исходным субстратом в 1.5; 1.8 и 1.4 раза соответственно; содержание белка и экстрактивных веществ увеличилось еще более значительно – в 14.2 и 5.2 раза по сравнению с субстратом до биодеструкции.

Для исследования возможности получения полноценных базидиом королевской вешенки (эринги) осуществили твердофазное культивирование штамма Pe-17Т (рис. 3Г-Е) на нескольких комбинациях растительных субстратов с обязательным добавлением двух типов послеэкстракционных отходов *O. secunda* и пшеничных отрубей, а также более крупных и твердых растительных компонентов (опилки березы и осины, щепа пихты). Установлено, что средняя длительность зарастания субстрата мицелием варьировала от 29 до 35 сут; массовая закладка примордиев происходила на 35–42 сут инкубации в зависимости от субстратной формулы (табл. 4). Максимальная продуктивность плодообразования отмечена на четырехкомпонентных субстратах с добавлением опилок березы или осины в количестве 20%, что по-видимому, обеспечило большую пористость субстрата и оптимальный газообмен. Средняя масса плодовых тел с одного блока составила соответственно 230 и 236 г; биологическая эффективность – 46 и 47.2%.

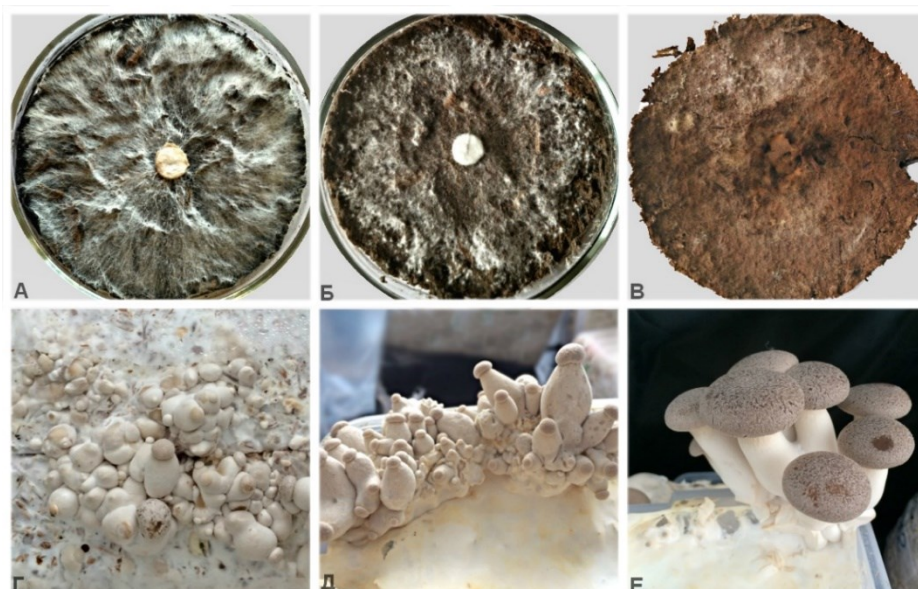


Рис. 3. Колонизация после экстракционных остатков *Orthilia secunda* базидиальными грибами А, Б – твердофазное культивирование штамма Tv2-16K *Trametes versicolor*; В – высушенный мицелиально-растительный продукт; Г, Д – формирование примордиев и Е – базидиом штаммом Ре-17Т *Pleurotus eryngii*

Таблица 3. Химический состав после экстракционных остатков *Orthilia secunda* до и после твердофазного культивирования базидиальных грибов

Показатель, % от а.с.с.	Остаток исходного сырья			Остаток каллусной ткани		
	до ферментации	после ферментации		до ферментации	после ферментации	
		<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Trametes versicolor</i>		<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Trametes versicolor</i>
Трудногидролизуемые полисахариды, ТГП	39.7±0.06	34.5±0.08	30.5±0.21	42.4±0.08	31.8±0.07	28.3±0.04
Легкогидролизуемые полисахариды, ЛГП	21.6±0.35	17.2±0.05	15.2±0.08	19.4±0.24	13.8±0.08	10.8±0.32
Лигниновые вещества	27.3±0.21	18.6±0.21	16.6±0.05	30.7±0.20	25.1±0.34	21.4±0.25
Экстрактивные вещества	8.3±0.04	21.1±0.10	27.2±0.15	4.7±0.09	18.2±0.02	24.3±0.06
Зольные вещества	2.3±0.12	2.9±0.09	2.8±0.15	1.9±0.15	2.3±0.10	2.4±0.12
Белок	0.8±0.10	3.7±0.02	7.7±0.09	0.9±0.08	8.8±0.05	12.8±0.25

Таблица 4. Показатели плодообразования штамма Ре-17Т *Pleurotus eryngii* на композициях растительных субстратов с использованием после экстракционных остатков *Orthilia secunda*

Субстратная формула	Длительность зарастания, сут	Массовая закладка примордиев, сут.	Масса плодовых тел с одного субстратного блока, г	Биологическая эффективность, %
ИС : КТ : ПО = 50 : 30 : 20	32	39	215	43.0
ИС : КТ : БО : ПО = 30 : 20 : 30 : 20	29	35	230	46.0
ИС : КТ : ОО : ПО = 30 : 20 : 30 : 20	30	35	236	47.2
ИС : КТ : БО : ПЩ : ПО = 30 : 10 : 20 : 20 : 20	35	42	194	38.8

Примечание: ИС – после экстракционный остаток исходного сырья *O. secunda*, КТ – после экстракционный остаток каллусной ткани *O. secunda*; БО – березовые опилки; ОО – осиновые опилки; ПЩ – пихтовая щепа.

Таким образом, показана возможность использования быстрорастущих штаммов базидиальных грибов и после экстракционных остатков лекарственного растения *O. secunda* по двум направлениям: 1. для получения мицелиально-растительного продукта (рис. 3В) со сниженным содержанием трудноперевариваемой фракции (полисахариды и лигнин) и обогащенного белковыми соединениями на основе штамма Tv2-16K *T.versicolor*; 2. получение плодовых тел вешенки эринги (рис. 3 Г-Д) на многокомпонентных субстратах с биологической эффективностью процесса от 39 до 47 % на основе штамма Ре-17Т *P. eryngii*.

Заключение

На примере быстрорастущих штаммов базидиальных грибов Tv2-16K *Trametes versicolor* и Pe-17T *Pleurotus eryngii* показана возможность утилизации после экстракционного остатка лекарственного растения *Orthilia secunda* (исходное сырье и каллусная ткань) с получением мицелиально-растительного продукта (со сниженным содержанием трудноперевариваемой фракции и обогащенного белком) и полноценных плодовых тел. Ростовые коэффициенты штаммов на растительных субстратах составили 65–77 ед. при радиальной скорости роста 2.0–2.3 мм/сут, что характеризует их, как растущие со средней скоростью; активность фермента фенолоксидаза варьировала в пределах от 0.7 до 1.2 ед/г·с.

Показана общая направленность биохимических изменений после экстракционного остатка исходного сырья и каллусной ткани *O. secunda* под действием ферментов базидиальных грибов (снижение доли полисахаридов и лигнина; увеличение содержания белка и экстрактивных веществ). Более глубокие превращения отмечены под действием штамма Tv2-16K *T. versicolor*: в биодеструктурированных субстратах содержание ТГП, ЛГП и лигниновых веществ уменьшилось в 1.3–1.5; 1.4–1.8 и 1.4–1.7 раз соответственно; содержание белка и экстрактивных веществ увеличилось в 9.6–14.2 и 3.3–5.2 раза в зависимости от типа растительного субстрата.

Получены плодовые тела съедобного гриба *P. eryngii* на композициях растительных субстратов с обязательным использованием двух типов после экстракционных остатков *O. secunda* и пшеничных отрубей. Максимальное плодообразование отмечено на четырехкомпонентных субстратах с добавлением опилок березы или осины в количестве 20%: средняя масса плодовых тел с одного блока составила соответственно 230 и 236 г; биологическая эффективность – 46 и 47.2%.

Список литературы

1. Барштейн В.Ю., Круподерова Т.А., Гармаш С.Н., Поспелов С.В., Поспелова А.Д., Нагорная С.В. Биоконверсия отходов агропромышленного комплекса. Новосибирск, 2016. 86 с.
2. Ботоева Е.А., Ломбоева С.С., Бураева Л.Б., Чукаев С.А. Химическое и фармакологическое исследование ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House // Сибирский медицинский журнал. 2003. №1. С. 69–71.
3. Aguilo-Aguayo I., Walton J., Viñas I., Tiwari B.K. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products // LWT-Food Science and Technology. 2017. Vol. 77. Pp. 92–99. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.043.
4. Atila F., Owaid M.N., Shariati M.A. The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: A review // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2017. Vol. 7. N3. Pp. 281–286. DOI: 10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.281-286.
5. Ghahremani-Majd H., Dashti F. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*) // Horticulture Environment and Biotechnology. 2015. Vol. 56. N3. Pp. 376–382. DOI: 10.1007/s13580-015-0124-z.
6. Береговая Т.В., Билай В.Т., Вассер С.П. и др. Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. Киев, 2012. 285 с.
7. Вассер С.П., Бойко С.М., Вонг К.Х. и др. Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. Киев, 2016. Т. 2. 261 с.
8. Mandeel Q.A., Al-Laith A.A., Mohamed S.A. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) on various lignocellulosic wastes // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 21. N4. Pp. 601–607. DOI: 10.1007/s11274-004-3494-4.
9. Garcha H.S., Khanna P.K., Soni G.L. Nutritional importance of mushrooms // Mushroom biology and mushroom products. Hong Kong, 1993.
10. Pedra M., Carnellosi G., Silva P., Yagui M.L., Lira G., Gonçalves B., Marino R. Chemical and sensorial analysis of *Pleurotus ostreatus* cultivated on coconut (*Cocos nucifera* Linn.) husk supplemented with wheat and/or rice bran // Archives of the Biological Institute. 2009. Vol. 76. Pp. 91–98.
11. Silva S., Martins S., Karmali A., Rosa E. Production, purification and characterization of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2012. Vol. 92. N9. Pp. 1826–1832. DOI 10.1002/jsfa.5560.
12. Zou Y., Du F., Zhang H., Hu Q. Evaluation of Korshinsk Peashrub (*Caragana korshinskii* Kom.) as a Substrate for the Cultivation of *Pleurotus eryngii* // Waste and Biomass Valorization. 2019. Vol. 10. Pp. 2879–2875. DOI: 10.1007/s12649-018-0301-2.
13. Funda A. Determining the Effects of Container Types on Yield and Fruitbody Features of *Pleurotus eryngii* Strains // International Journal of Crop Science and Technology. 2017. Vol. 3. N1. Pp. 7–14.
14. Jeznabadi E.K., Jafarpour M., Eghbalsaid S., Pessaraki M. Effects of Various Substrates and Supplements on King Oyster (*Pleurotus eryngii*) // Compost Science & Utilization. 2016. Vol. 25. N1. Pp. 1–10. DOI: 10.1080/1065657X.2016.1238787.
15. Sardar H., Ali M.A., Anjum M.A., Nawaz F., Hussain S., Naz S., Karimi S.M. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) // Scientia Horticulturae. 2017. Vol. 225. Pp. 327–334. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.07.010.
16. Waseem I., Jahangir M.M., Ayyub C.M., Khan N.A., Ghufrana S., Khatana M.A. Optimization of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) production against cotton waste and fenugreek straw // Pakistan Journal of Phytopathology. 2018. Vol. 30. N2. Pp. 149–154. DOI: 10.33866/phytopathol.030.02.0435.

17. Funda A. Evaluation of Suitability of Various Agro-Wastes for Productivity of *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus eryngii* Mushrooms // Journal of Experimental Agriculture International. 2017. Vol. 17. N5. Pp. 1–11. DOI: 10.9734/JEAI/2017/36346.
18. Xie C., Yan L., Gong W., Zhu Z., Tan S., Chen D., Hu Z., Peng, Y. Effects of Different Substrates on Lignocellulosic Enzyme Expression, Enzyme Activity, Substrate Utilization and Biological Efficiency of *Pleurotus Eryngii* // Cellular Physiology and Biochemistry. 2016. Vol. 34. N9. Pp. 1479–1494. DOI: 10.1159/000447851.
19. Sakellari A., Karavoltos S., Tagkouli D., Rizou C., Sinanoglou V.J., Zoumpoulakis P., Koutrotsios G., Zervakis I.G., Kalogeropoulos N. Trace Elements in *Pleurotus Ostreatus*, *P. Eryngii*, and *P. Nebrodensis* Mushrooms Cultivated on Various Agricultural By-Products // Analytical Letters. 2019. Pp. 1–18. DOI: 10.1080/00032719.2019.1594865.
20. Avni S., Ezove N., Hanani H., Yadid I., Karpovsky M., Hayby H., Gover O., Hadar Y., Schwartz B., Danay O. Olive Mill Waste Enhances -Glucan Content in the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii* // International Journal of Molecular Sciences. 2017. Vol. 18. N7. Pp. 1–11.
21. Maity K.K., Patra S., Dey B., Bhunia S.K., Mandal S., Das D., Majumdar D.K., Maiti S., Maiti T.K., Islam S.S. A heteropolysaccharide from aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus ostreatus* cultivar: structural and biological studies // Carbohydrate Research. 2011. Pp. 366–372.
22. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Литовка Ю.А. Биоконверсия вегетативной части топинамбура микро- и макроскопическими грибами // Системы. Методы. Технологии. Братск, 2016. С. 147–151.
23. Павлов И.Н., Литовка Ю.А., Мулява В.В., Сафронова И.Е., Кулаков С.С., Пашенова Н.В., Мулява В.Е. Биоконверсия отходов лесопереработки ксилотрофным базидиомицетом *Pleurotus eryngii* (DC.) QUÉL // АгроЭкоИнфо. Красноярск, 2017. С. 26.
24. Bonatti M., Karnopp P., Soares H.M., Furlan S.A. Studies of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* mushrooms composition cultivated in banana straw // Health and Environment Journal. 2003. Pp. 31–35.
25. Бабицкая В.Г. Ферментативная деградация лигнина, содержащегося в растительных субстратах, мицелиальными грибами // Прикладная биохимия и микробиология. 1994. С. 827–835.
26. Planinić M., Zelić B., Čubel I., Bucić-Kojić A., Tišma M. Corn forage biological pretreatment by *Trametes versicolor* in a tray bioreactor // Waste Management & Research. Kuala Lumpur, 2016. Pp. 802–809.
27. Pinheiro V.E., Michelin M., Vici A.C., de Almeida P.Z., Teixeira de Moraes Polizeli M.L. *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray // Bioprocess and Biosystems Engineering. 2019. Pp. 1–8. DOI: 10.1007/S00449-019-02245-Z.
28. Zeng S., Zhao J., Xia L. Simultaneous production of laccase and degradation of bisphenol A with *Trametes versicolor* cultivated on agricultural wastes // Bioprocess and Biosystems Engineering. 2017. Vol. 40. N8. Pp. 1237–1245. DOI: 10.1007/S00449-017-1783-1.
29. Xu L., Sun K., Wang F., Zhao L., Hu J., Ma H., Ding Z. Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization // Journal of Environmental Management. 2020. Vol. 270. Pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110904.
30. Singh J., Kumar P., Saharan V., Kapoor R.K. Simultaneous laccase production and transformation of bisphenol-A and triclosan using *Trametes versicolor* // 3 Biotech. 2019. Vol. 9(4). 129. DOI: 10.1007/s13205-019-1648-1.
31. Bucić-Kojić A., Šelo G., Zelić B., Planinić M., Tišma M. Recovery of Phenolic Acid and Enzyme Production from Corn Silage Biologically Treated by *Trametes versicolor* // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2016. Vol. 181. N3. Pp. 1–13. DOI 10.1007/s12010-016-2261-y.
32. Jones M.P., Lawrie A.C., Huynh T.T., Morrison P.D., Mautner A., Bismarck A., Sabu J. Agricultural by-product suitability for the production of chitinous composites and nanofibers utilizing *Trametes versicolor* and *Polyporus brumalis* mycelial growth // Process Biochemistry. 2019. Vol. 80. N1. Pp. 95–102. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.018.
33. Методы экспериментальной микологии / под ред. В.И. Билай. Киев, 1982. 550 с.
34. Bradner J.R., Gillings M., Nevalainen K.M.H. Qualitative assessment of hydrolytic activities in antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media // World Journal of Microbiology & Biotechnology. 1999. Vol. 15. Pp. 131–132.
35. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев, 1988. 144 с.
36. Физиология растений / под ред. И.П. Ермакова. М.: Академия, 2005. 640 с.
37. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиология растений. 1982. Т. 29. №1. С. 198–203.
38. Ермаков А.Е., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. Л., 1988. 430 с.
39. Ушанова В.М., Лебедева О.И., Девятловская А.Н. Основы научных исследований. Красноярск, 2004. 359 с.
40. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1991. 320 с.

Поступила в редакцию 8 сентября 2020 г.

Принята к публикации 13 ноября 2020 г.

Для цитирования: Кох Ж.А., Литовка Ю.А., Эназаров Р.Х., Маколова П.В., Шимова Ю.С., Почкутов И.С., Павлов И.Н. Биотехнологические аспекты утилизации послеэкстракционной биомассы и клеточной культуры *Orthilia secunda* (L.) House базидиальными грибами // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 359–369. DOI: 10.14258/jcrpm.2020048392.

Koh Zh.A.^{1,2*}, Litovka Yu.A.^{1,3}, Enazarov R.Kh.¹, Makolova P.V.¹, Shimova Yu.S.³, Pochekutov I.S.³, Pavlov I.N.^{1,3} BIO-TECHNOLOGICAL ASPECTS OF BIOCONVERSION OF POST-EXTRACTION BIOMASS AND CELL CULTURE OF *ORTHILIA SECUNDA* (L.) HOUSE WITH BASIDIOMYCETES

¹ Institute of Forest named after V.N. Sukachev SB RAS, FRC KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 (Russia), e-mail: jannetta-83@mail.ru

² Krasnoyarsk State Agrarian University, pr. Mira, 90, Krasnoyarsk, 660049 (Russia)

³ Siberian State University of Science and Technology named after academician M.F. Reshetneva, pr. Mira, 82, Krasnoyarsk, 660049 (Russia)

The possibility of bioconversion after the extraction residue of the medicinal plant *Orthilia secunda* (initial plant biomass and callus after extraction of biologically active substances) by fast growing strains of basidiomycetes Tv2-16K *Trametes versicolor* and Pe-17T *Pleurotus eryngii* was studied. The main target products are: a mycelial-plant product with a reduced content of the indigestible fraction and enriched in protein and full-fledged fruit bodies. Fungi colonize plant waste with a radial growth rate of 2.0–2.3 mm / day and a growth rate of 65–77 units. Phenol oxidase activity is 0.7–1.2 units/g·s, depending on the type after the extraction residue. In substrates after biodegradation, the proportion of difficult hydrolysable polysaccharides, easily hydrolysable polysaccharides, and lignin is on average 1.6 times lower than in the original substrate. The content of protein and extractive substances is significantly higher, especially after the extraction residue of *O. secunda* callus under the influence of the *T. versicolor* strain Tv2-16K: 12.8 and 24.3%, respectively, of the mass of dry substrate. Fruit bodies of *P. eryngii* strain Pe-17T were obtained on various compositions of plant substrates. The maximum fruit formation was noted on four-component substrates containing two types after extraction residues of *O. secunda*, wheat bran, birch or aspen sawdust: the average weight of fruit bodies from one block was 230–236 g; biological efficiency – 46–47.2%.

Keywords: biodegradation, basidiomycetes, post-extraction residue, callus tissue, solid-phase cultivation, *Orthilia secunda*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes versicolor*.

References

1. Barshteyn V.Yu., Krupoderova T.A., Garmash S.N., Pospelov S.V., Pospelova A.D., Nagornaya S.V. *Biokonversiya otkhodov agropromyshlennogo kompleksa*. [Bioconversion of agro-industrial waste]. Novosibirsk, 2016, 86 p. (in Russ.).
2. Botoyeva Ye.A., Lomboyeva S.S., Burayeva L.B., Chukayev S.A. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*, 2003, no. 1, pp. 69–71. (in Russ.).
3. Aguilo-Aguayo I., Walton J., Viñas I., Tiwari B.K. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, vol. 77, pp. 92–99. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.043.
4. Atila F., Owaid M.N., Shariati M.A. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 281–286. DOI: 10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.281-286.
5. Ghahremani-Majd H., Dashti F. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 2015, vol. 56, no. 3, pp. 376–382. DOI: 10.1007/s13580-015-0124-z.
6. Beregovaya T.V., Bilay V.T., Vasser S.P. i dr. *Makromitsety: lekarstvennyye svoystva i biologicheskiye osobennosti*. [Macromycetes: medicinal properties and biological characteristics]. Kiev, 2012, 285 p. (in Russ.).
7. Vasser S.P., Boyko S.M., Vong K.Kh. i dr. *Makromitsety: lekarstvennyye svoystva i biologicheskiye osobennosti*. [Macromycetes: medicinal properties and biological characteristics]. Kiev, 2016, vol. 2, 261 p. (in Russ.).
8. Mandeel Q.A., Al-Laith A.A., Mohamed S.A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, vol. 21, no. 4, pp. 601–607. DOI: 10.1007/s11274-004-3494-4.
9. Garcha H.S., Khanna P.K., Soni G.L. *Mushroom biology and mushroom products*, Hong Kong, 1993.
10. Pedra M., Carnelossi G., Silva P., Yagui M.L., Lira G., Gonçalves B., Marino R. *Archives of the Biological Institute*, 2009, vol. 76, pp. 91–98.
11. Silva S., Martins S., Karmali A., Rosa E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, vol. 92, no. 9, pp. 1826–1832. DOI 10.1002/jsfa.5560.
12. Zou Y., Du F., Zhang H., Hu Q. *Waste and Biomass Valorization*, 2019, vol. 10, pp. 2879–2875. DOI: 10.1007/s12649-018-0301-2.
13. Funda A. *International Journal of Crop Science and Technology*, 2017, vol. 3, no. 1, pp. 7–14.
14. Jeznabadi E.K., Jafarpour M., Eghbalsaied S., Pesarakli M. *Compost Science & Utilization*, 2016, vol. 25, no. 1, pp. 1–10. DOI: 10.1080/1065657X.2016.1238787.
15. Sardar H., Ali M.A., Anjum M.A., Nawaz F., Hussain S., Naz S., Karimi S.M. *Scientia Horticulturae*, 2017, vol. 225, pp. 327–334. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.07.010.
16. Waseem I., Jahangir M.M., Ayyub C.M., Khan N.A., Ghufrana S., Khatana M.A. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 2018, vol. 30, no. 2, pp. 149–154. DOI: 10.33866/phytopathol.030.02.0435.
17. Funda A. *Journal of Experimental Agriculture International*, 2017, vol. 17, no. 5, pp. 1–11. DOI: 10.9734/JEAI/2017/36346.
18. Xie C., Yan L., Gong W., Zhu Z., Tan S., Chen D., Hu Z., Peng, Y. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, vol. 34, no. 9, pp. 1479–1494. DOI: 10.1159/000447851.
19. Sakellari A., Karavoltos S., Tagkouli D., Rizou C., Sinanoglou V.J., Zoumpoulakis P., Koutrotsios G., Zervakis I.G., Kalogeropoulos N. *Analytical Letters*, 2019, pp. 1–18. DOI: 10.1080/00032719.2019.1594865.

* Corresponding author.

20. Avni S., Ezove N., Hanani H., Yadid I., Karpovsky M., Hayby H., Gover O., Hadar Y., Schwartz B., Danay O. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, no. 7, pp. 1–11.
21. Maity K.K., Patra S., Dey B., Bhunia S.K., Mandal S., Das D., Majumdar D.K., Maiti S., Maiti T.K., Islam S.S. *Carbohydrate Research*, 2011, pp. 366–372.
22. Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Litovka Yu.A. *Sistemy. Metody. Tekhnologii*. [Systems. Methods. Technology]. Bratsk, 2016, pp. 147–151. (in Russ.).
23. Pavlov I.N., Litovka Yu.A., Mulyava V.V., Safronova I.Ye., Kulakov S.S., Pashenova N.V., Mulyava V.Ye. *Agro-EkoInfo*. [Agro-EcoInfo]. Krasnoyarsk, 2017, p. 26. (in Russ.).
24. Bonatti M., Karnopp P., Soares H.M., Furlan S.A. *Health and Environment Journal*, 2003, pp. 31–35.
25. Babitskaya V.G. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1994, pp. 827–835. (in Russ.).
26. Planinić M., Zelić B., Čubel I., Bucić-Kojić A., Tišma M. *Waste Management & Research*, Kuala Lumpur, 2016, pp. 802–809.
27. Pinheiro V.E., Michelin M., Vici A.C., de Almeida P.Z., Teixeira de Moraes Polizeli M.L. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, pp. 1–8. DOI: 10.1007/S00449-019-02245-Z.
28. Zeng S., Zhao J., Xia L. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, vol. 40, no. 8, pp. 1237–1245. DOI: 10.1007/S00449-017-1783-1.
29. Xu L., Sun K., Wang F., Zhao L., Hu J., Ma H., Ding Z. *Journal of Environmental Management*, 2020, vol. 270, pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110904.
30. Singh J., Kumar P., Saharan V., Kapoor R.K. *3 Biotech.*, 2019, vol. 9(4), 129. DOI: 10.1007/s13205-019-1648-1.
31. Bucić-Kojić A., Šelo G., Zelić B., Planinić M., Tišma M. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, vol. 181, no. 3, pp. 1–13. DOI 10.1007/s12010-016-2261-y.
32. Jones M.P., Lawrie A.C., Huynh T.T., Morrison P.D., Mautner A., Bismarck A., Sabu J. *Process Biochemistry*, 2019, vol. 80, no. 1, pp. 95–102. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.018.
33. *Metody eksperimental'noy mikologii* [Methods of experimental mycology], ed. V.I. Bilay. Kiev, 1982, 550 p. (in Russ.).
34. Bradner J.R., Gillings M., Nevalainen K.M.H. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1999, vol. 15, pp. 131–132.
35. Bukhalo A.S. *Vysshiy s'yedobnyye bazidiomitsety v chistoy kul'ture*. [Higher edible Basidiomycetes in pure culture]. Kiev, 1988, 144 p. (in Russ.).
36. *Fiziologiya rasteniy* [Plant Physiology], ed. I.P. Yermakov. Moscow, 2005, 640 p. (in Russ.).
37. Buzun G.A., Dzhemukhadze K.M., Milesenko L.F. *Fiziologiya rasteniy*, 1982, vol. 29, no. 1, pp. 198–203. (in Russ.).
38. Yermakov A.Ye., Arasimovich V.V., Yarosh N.P. *Metody biokhimitseskogo issledovaniya rasteniy*. [Biochemical research methods of plants]. Leningrad, 1988, 430 p. (in Russ.).
39. Ushanova V.M., Lebedeva O.I., Devyatlovskaya A.N. *Osnovy nauchnykh issledovaniy*. [Fundamentals of Scientific Research]. Krasnoyarsk, 2004, 359 p. (in Russ.).
40. Obolenskaya A.V., Yel'nitskaya Z.P., Leonovich A.A. *Laboratornyye raboty po khimii drevesiny i tsellyulozy*. [Laboratory work on the chemistry of wood and cellulose]. Moscow, 1991, 320 p. (in Russ.).

Received September 8, 2020

Accepted November 13, 2020

For citing: Koh Zh.A., Litovka Yu.A., Enazarov R.Kh., Makolova P.V., Shimova Yu.S., Pochekutov I.S., Pavlov I.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 359–369. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020048392.

